

Regulación del ciclo celular por ploidía en *Saccharomyces cerevisiae*

Joan Marc Martínez Láinez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Universitat Internacional de Catalunya
Facultat de Medicina y Ciències de la Salut

**Regulación del ciclo celular por ploidía en
*Saccharomyces cerevisiae***

Joan Marc Martínez Láinez

2017



**Regulación del ciclo celular por ploidía en
*Saccharomyces cerevisiae***

Joan Marc Martínez Láinez

**Memoria presentada para optar al título de doctor por la
Universidad Internacional de Cataluña.**

Barcelona, 2017

Trabajo codirigido por el Dr. Josep Clotet Erra del área de Ciencias Básicas de la Universitat Interacional de Catalunya y el Dr. Martí Aldea Malo del Institut de Biologia Molecular de Barcelona (CSIC). Y participación como tutor por el Dr. Javier Jiménez Jiménez del área de Ciencias Básicas de la Universitat Interacional de Catalunya.

A mi familia

TRAYECTORIA

Mi tesis doctoral comenzó en enero del 2013 y acabó el enero del 2017. Durante estos 4 años he tenido la posibilidad de trabajar en varios proyectos, cada uno con determinados procedimientos experimentales, que me han permitido formarme como científico y obtener un amplio abanico de metodologías del estudio en Biología Molecular de la levadura de gemación, específicamente en ciclo celular y regulación del metabolismo de fosfatos.

Durante los dos primeros años inicié mis estudios con un proyecto en el que estudiaba nuevos substratos para Pho85 y su implicación en levadura y a demás tuve la posibilidad de participar un proyecto relacionado con el metabolismo de los polifosfatos bajo la dirección del Dr. Josep Clotet Erra. Este último condujo a la publicación del trabajo en agosto del 2016, en el que conjuntamente al Dr. Samuel Bru Rullo, como coautor, con el título "*Polyphosphate is involved in cell cycle progression and genomic stability in Saccharomyces cerevisiae*".

Durante los dos últimos tuve la posibilidad de establecerme físicamente con el grupo del Dr. Marti Aldea Malo, para llevar a cabo el estudio de un fenómeno implicado en la regulación del ciclo celular y tamaño celular dependiente de la ploidía. Durante este periodo surgieron una gran cantidad de resultados que indicarían un nuevo mecanismo de control desconocido, se creyó de gran interés y en un futuro próximo serán propuestos para su publicación.

A continuación, pasamos a conocer de qué trata esta tesis y a detallar los resultados que hemos podido conseguir.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2. El ciclo celular	5
Sistema de control del ciclo celular	7
CDC28: la principal CDK del ciclo celular y sus ciclinas	10
3. Maquinaria y ejecución de <i>START</i>	11
Regulón G ₁ /S	13
4. Regulación del sistema de control por degradación por ubiquitinación	13
El complejo SCF	15
El complejo APC/C	17
5. Regulación del sistema de control por el centrómero	19
El centrómero	19
El cinetocoro	20
El SAC	22
MCC, efector del SAC	23
6. Regulación del tamaño celular	25
Regulación del tamaño celular en <i>S. cerevisiae</i>	26
Tamaño celular y la ploidía	28
7. Vectores y el tamaño celular	30
Tipos de vectores lanzadera	31
Alteración del tamaño celular por vectores: observaciones preliminares	33
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
MATERIAL Y MÉTODOS	39
1. Medios y condiciones de cultivo	41
Medios	41
Condiciones de cultivo	41
2. Construcción de cepas de levadura	42
Cepas de origen o previamente construidas	42
Obtención de casetes de modificación genética	42

ÍNDICE

Modificación mediante el sistema <i>CRISPR/CAS9</i>	43
Transformación de levaduras	45
PCR de colonia	46
Extracción rápida de DNA genómico de levadura	47
Obtención de células diploides	47
3. Construcción de plásmidos y clonaje de genes	47
Clonación de genes y vectores receptores	48
Construcción por recombinación homóloga	48
Transformación en células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	48
Extracción rápida de plásmidos (<i>Jet Preps</i>)	49
Extracción de plásmidos para utilización experimental (<i>Mini Preps</i>)	49
4. Técnicas de proteína	50
Análisis de interacción a pequeña escala de proteínas con marcaje GST	50
<i>Western Blot</i> de transferencia Semiseca	50
5. Métodos de biología celular	51
Sincronización de células en G ₁ mediante α -factor	51
Procesado de células mediante citometría de flujo (FACS)	52
Tinción de núcleos con DAPI para levaduras	52
Enriquecimiento de células de primer ciclo (gradientes de Ficoll)	52
6. Técnicas de Microscopia <i>in vivo</i>	53
Preparado y fijado de las células	53
Obtención de imágenes	53
Análisis de imágenes y obtención de resultados	54
Estudio estadístico	55
RESULTADOS	57
Los YCp incrementan el volumen crítico durante G ₁	59
El volumen celular depende del número de copias de YCp	60
El incremento en volumen no responde a un incremento total de DNA	62
El centrómero, inductor del incremento en el volumen celular	63
Los YAC inducen el incremento en el volumen dependiente a su número	65

Cromosomas dicéntricos condicionales incrementan el volumen de gemación	67
Los YCps comprometen la progresión por el ciclo celular durante la fase G ₁	68
El centrómero compromete el funcionamiento de la maquinaria de <i>START</i>	70
Los centrómeros reducen la acumulación nuclear de Cln3	73
Las proteínas reguladoras centroméricas (CRPs) afectadas por la dosis centromérica	75
La regulación del tamaño por ploidía no depende exclusivamente de CRPs	77
La superexpresión de CRPs no recapitula la respuesta a los centrómeros	79
Efectos de la superexpresión de Mad3-KEN30AAA y Mad3-5A	80
El SCF está implicado en el incremento de tamaño dependiente de centrómeros.	81
Mad3 necesita a Bub3 para mediar el incremento de volumen por centrómeros	83
Mad3 interacciona <i>in vivo</i> con Cln3 y Cdc4.	84
DISCUSIÓN	87
El centrómero, de la toxicidad a la regulación del tamaño	89
celular Tamaño por ploidía y la maquinaria de <i>START</i>	90
Degradación nuclear de Cln3 dependiente del centrómero	93
Los CSPs pueden constituir un nuevo checkpoint de G ₁	94
Un nuevo modelo de regulación del tamaño celular por Mad3	96
CONCLUSIONES	99
TABLAS ADICIONALES	103
Tabla de anticuerpos utilizados en western blot y inmunoprecipiación	105
Tabla de cepas utilizadas para este estudio	106
Tabla de plásmidos utilizadas para este estudio	107
Tabla de oligonucleótidos utilizadas para <i>CRISPR/CAS9</i>	110
Tabla de abreviaturas	112
RESUMEN	113
Resumen en español	115
Resumen en inglés	117
BIBLIOGRAFÍA	119
AGRADECIMIENTOS	149

INTRODUCCIÓN

1. *Saccharomyces cerevisiae*

A lo largo de toda la tesis se utilizó la levadura *S. cerevisiae* como modelo base para nuestra investigación. Considero interesante realizarle una pequeña introducción para detallar la importancia de su uso como modelo. Los elegantes experimentos que se han desarrollado, utilizando este modelo durante varias décadas, han contribuido sustancialmente al conocimiento científico y, actualmente continúa siendo un soporte útil para investigar los complejos sistemas moleculares que regulan la vida. Porque aún no se conoce lo suficiente como para explicar la mayoría de procesos celulares.

Este pequeño microorganismo unicelular, un hongo ascomiceto, que realiza la mitosis mediante división asimétrica por gemación (Figura 1), con un tamaño de 10µm de diámetro [1], se puede encontrar de forma natural y abundante sobre los viñedos y robles [2]. Entre los años 1930 y 1940, se introduce la primera investigación científica que utiliza esta levadura como modelo por los investigadores Øjvind Winge y Carl Lindegren [3] y desde entonces hasta nuestro tiempo, se ha utilizado este organismo para el estudio de muchos genes y enfermedades en mamíferos y eucariotas superiores, gracias a que sus genes y su función se mantienen con una alta homología a lo largo de la evolución [4].

Esta levadura al ser empleada como organismo modelo en el laboratorio, ofrece grandes posibilidades gracias a su fácil manipulación [5] y rápido crecimiento, un ciclo celular se da durante tan solo 90min, como media, en condiciones nutricionales ricas [6]. Se conoce una gran batería de técnicas y protocolos que permiten de forma rápida la modificación y edición de su genoma, y el estudio de sus efectos [7]. Incluyendo que se dispone toda su información genómica ya que fue el primer organismo eucariota en ser secuenciado [8].

En la naturaleza, estas células han evolucionado para poder dar respuesta a múltiples situaciones que el ambiente pueda aportar. Por este motivo se observa como articulan un gran número de mecanismos para mantener su viabilidad celular, permitiendo una gran versatilidad de adaptación a las diferentes situaciones y en el uso de los nutrientes que están a su alcance. Como ejemplo, el uso de diferentes fuentes de energía, pudiendo utilizar desde glucosa hasta aminoácidos (aa) [9], fuentes de carbono fermentables (glucosa, fructosa, galactosa, rafinosa, maltosa, sacarosa) como no fermentables (etanol, glicerol, acetato). Por otra banda se observa cómo son capaces de adaptarse a diferentes cambios de pH [10], a cambios en la

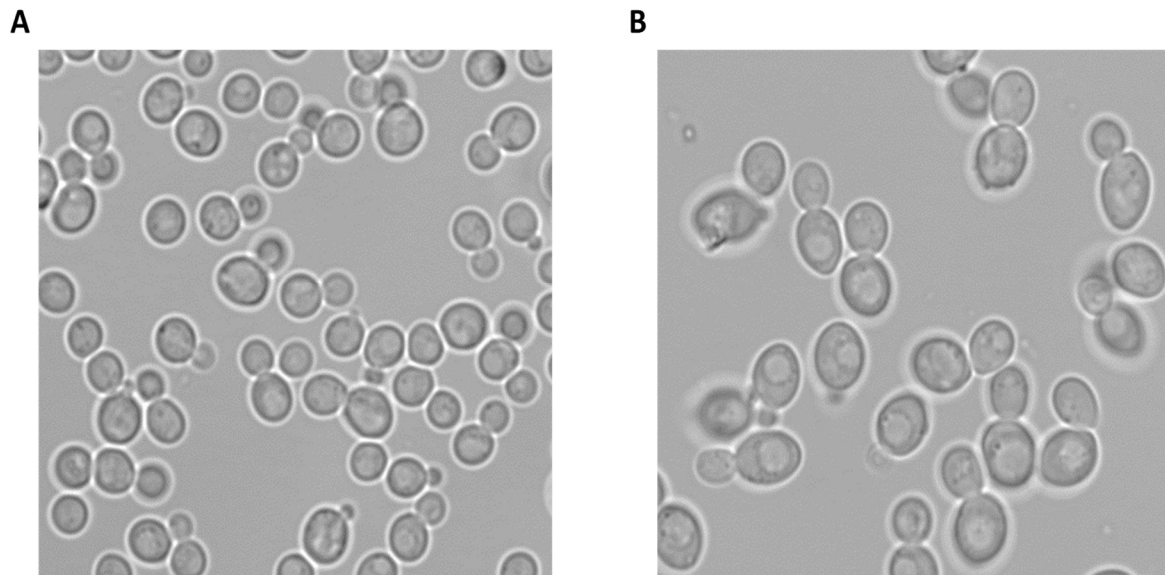


Figura 1: *S. cerevisiae*

Imágenes obtenidas mediante campo claro en microscopio óptico. Células de cultivos asincrónicos en medio rico donde se muestran las diferentes formas de la levadura durante el ciclo celular, para una cepa haploide, CML128 (A) y una cepa diploide, 1788 (B).

presión osmótica [11]–[13], cambios de temperatura [14], [15] y además modificar sus características de ploidía dependiendo de las restricciones en nutrientes, como es la aparición de células haploides (Figura 1A) a partir de células diploides (Figura 1B) por meiosis [16].

La conservación de las vías de regulación del ciclo celular y la investigación en este campo han posibilitado grandes avances en el conocimiento y la función de muchos de estos genes, como las ciclinas, y en cómo regulan el ciclo celular. Los descubrimientos fueron tan relevantes que los investigadores de levadura Leland H. Hartwell (*S. cerevisiae*) y Paul M. Nurse (*Schizosaccharomyces pombe*) y el investigador utilizando el erizo de mar, R. Timothy Hunt (*Spisula solidissima*), fueron laureados con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología del año 2001.

Estos motivos animan a utilizar a esta levadura como modelo de estudio, ya que durante la tesis se trabajó con componentes del ciclo celular, y cómo éstos regulan el tamaño de las células. Es interesante, especialmente, ya que se conoce que en esta especie hay una regulación activa que determina el tamaño celular dependiente de factores de la fase G₁, que permite un sistema robusto de control del tamaño celular [17].

2. El ciclo celular

Todas las células que tienen como destino el crecimiento y reproducción, para el prolongamiento de la vida sobre la tierra, lo logran gracias a un programa molecular complejo, que se repite constantemente, con la finalidad de obtener la copia física de este organismo manteniendo las características propias de la especie a la que pertenecen para perpetuarlas a lo largo del tiempo.

El ciclo celular en eucariotas (Figura 2) ha sido descrito siempre como un círculo, que se delimita por los eventos más importantes que incluyen desde el crecimiento celular, duplicación del DNA, división nuclear (mitosis) y la división celular (citocinesis). Dividimos el ciclo celular, por tanto, en dos interfases, en las que la célula obtiene tiempo para su crecimiento y preparación para las fases contiguas (fases G_1 y G_2), una fase en la que el DNA es replicado (fase S) y actúan mecanismos de reparación del DNA si es dañado, y finalmente cuando las células están preparadas será dar lugar a su división en el último periodo (fase M), en el que tiene lugar la mitosis y la citocinesis iniciando nuevamente el ciclo.

En *S. cerevisiae* (Figura 2B, 2C) durante la primera fase del ciclo, G_1 , la célula aumenta su tamaño hasta el llamado tamaño crítico, cuya regulación depende de los elementos del ciclo celular y chaperonas implicadas [18]. Se prepara, además, gracias a una alta actividad transcripcional y traduccional para la duplicación del DNA. Cuando los elementos son suficientes y el ambiente correcto para comprometerse a iniciar un nuevo ciclo celular, se ejecuta *START* [19], una transición que conduce a un estado irreversible para finalizar la fase G_1 . Seguidamente se da inicio a la fase S, donde se da la duplicación del DNA y el crecimiento polarizado de la célula hija en forma de gema [20]. Tras esta fase se encuentra la fase G_2 , en la que se mantiene el crecimiento de la gema, pero de forma isotrópica, la preparación de la maquinaria para la entrada a la mitosis y actividad de diferentes mecanismos de reparación del DNA. En la última fase las cromátidas hermanas son compactadas y unidas a microtúbulos, que provienen de los cuerpos polares del huso (o SPBs, siglas del inglés *spindle pole body*), que al situarse en los lugares opuestos al núcleo alinean las cromátidas en el centro formado la llamada placa metafásica. Una vez este proceso se completa correctamente y se consigue la correcta bi-orientación de todos los pares de cromátidas hermanas, se destruye la unión que se mantiene entre ellas y son atraídas hacia los SPBs durante la anafase. Una vez acabada la mitosis, se da lugar a la

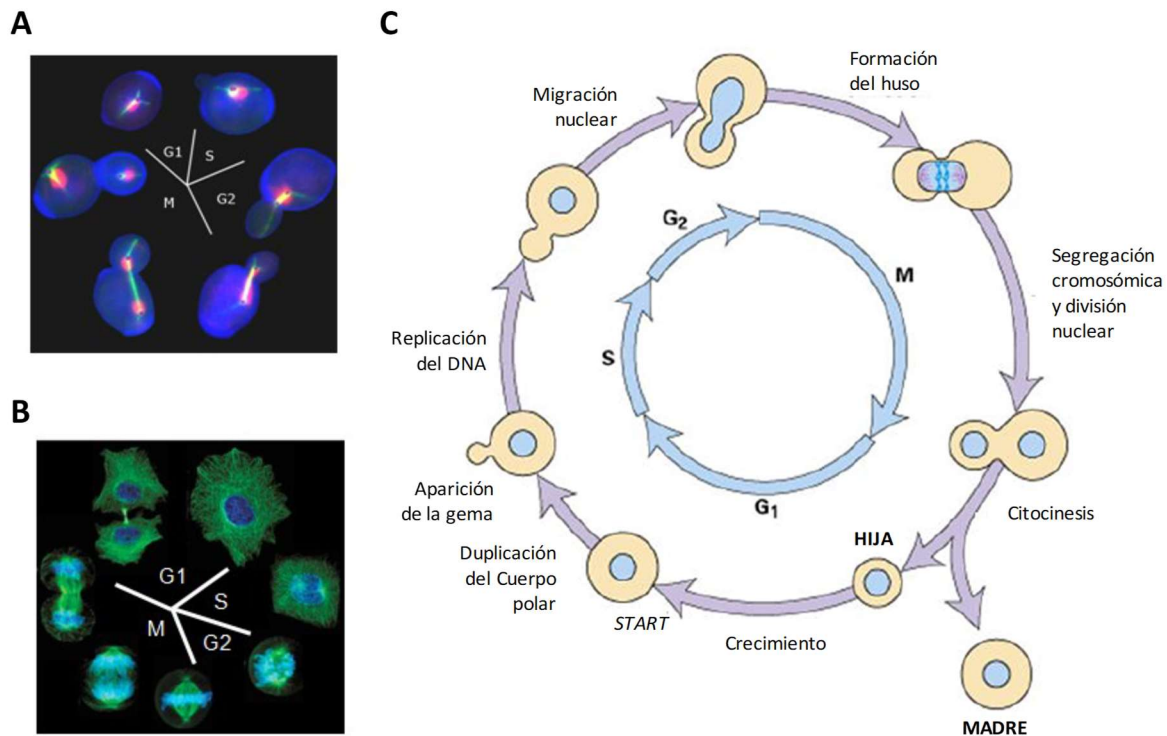


Figura 2: Ciclo celular en eucariotas

Comparativa realista de los ciclos y morfologías bajo el microscopio para *S. cerevisiae* (A) y células de mamífero (B) Esquema básico del ciclo celular en *S. cerevisiae* (C), se representa las diferentes morfologías durante las diferentes fases del ciclo: G₁, S, G₂ y M y los principales eventos, adaptado de *Jhons Hopkins University*.

citocinesis dando como resultado dos células que mantienen el mismo número cromosómico que la célula original.

Dado que en este organismo la mitosis se da en forma de gemación se producen dos tipos de células que varían en tamaño cada ciclo celular: una célula madre (generadora de la nueva gemación) y una célula hija o recién nacida (procedente de la nueva gema). Los tiempos de ejecución de las diferentes fases varían, especialmente en G₁, ya que las células recién nacidas deberán alcanzar el tamaño crítico de *START* para lograr la gemación. Un cultivo celular en condiciones óptimas de laboratorio en presencia de glucosa como fuente de energía y carbono mantiene un tiempo medio aparente de duplicación de aproximadamente 90 minutos (min). Una célula hija tiene una duración aproximada de la fase G₁ de 42 min y fase S/G₂/M de 57 min, comportando una duración de ciclo completo 97 min. En el caso de la célula madre la duración aproximada de la fase G₁ es de 22 min y fase de S/G₂/M de 59 min, duración de ciclo completo de 81 min [6].

Sistema de control del ciclo celular

Para asegurarse un paso correcto y ordenado por los diferentes eventos del ciclo celular, las células contienen un sistema complejo de regulación llamado sistema de control del ciclo celular. El principal componente de este sistema lo forman las llamadas quinasas dependientes de ciclinas (o CDKs, siglas del inglés *Cyclin Dependent Kinases*). En *S. cerevisiae* se han descrito 6 CDKs diferentes (Tabla 1). La identificación de las diferentes CDK ha sido posible por la presencia de una secuencia canónica en el extremo N-terminal, conocido como motivo PSTAIRE [21]. Estas quinasas son capaces de catalizar la unión covalente del grupo fosfato proveniente del ATP a diferentes proteínas que son usadas como sustrato. Para que se dé esta actividad quinasas, las CDKs necesitan modificar su conformación al unirse a las subunidades proteínicas llamadas ciclinas, dando lugar al complejo ciclina/CDK. Las ciclinas presentes en el genoma de la levadura son 23, identificadas por la presencia de un dominio conservado llamado *cyclin box*, que permite la unión y activación de la CDK [22], [23]. Estas varían durante el ciclo celular modificando la especificidad de los sustratos a fosforilar por la CDK, y serán reguladas por diferentes inhibidores específicos conllevando una activación selectiva de diferentes eventos en la célula.

Los diferentes complejos ciclina/CDK pueden ser clasificados según su existencia a lo largo de las diferentes etapas del ciclo celular (Figura 3), G₁-, G₁/S-, S- y M-CDKs. Cada una de ellas activará la siguiente fase, manteniendo un estricto orden y participando en la regulación de los tres mayores *checkpoints* que presenta el ciclo celular: *START*, que determina la entrada al ciclo en una etapa tardía de G₁; *checkpoint* G₂/M, que determina una entrada a mitosis controlada; y finalmente dentro de la fase M se encuentra la transición metafase-anafase. Mientras que la concentración de la CDK se mantiene estable a lo largo del ciclo, su actividad está gobernada por múltiples mecanismos de regulación como son la concentración de las ciclinas presentes, moduladas por cambios en su expresión y/o degradación, y cambios en los niveles de proteínas inhibidoras de CDK. Los complejos G₁/S-, S- y M-CDK se mantienen inactivos durante G₁ gracias a los bajos niveles de las ciclinas correspondientes, ya sea por inhibición de su expresión o por degradación mediante el complejo E3 ubiquitin ligasa conocido como complejo promotor de la anafase o ciclosooma (APC/C, de las siglas en inglés Anaphase-Promoting Complex), que elimina específicamente las ciclinas de fase S y M (no las G₁/S) por proteólisis, y también por la presencia de altas concentraciones de inhibidores de complejos S- y M-CDK. El

Tabla 1: CDKs y ciclinas de *S. cerevisiae*.

Resumen de las diferentes funciones de los complejos Ciclina/CDK.

CDK	Ciclina	Función
Cdc28 (CDK1)	Cln1, Cln2, Cln3	Esenciales para <i>START</i> : activación transcripción G_1 , gemación, crecimiento polarizado, duplicación cuerpos polares del huso, proteólisis de Sic1, adquisición resistencia a feromonas (Fase G_1 y G_1/S).
	Clb5, Clb6	Replicación del DNA (Fase S).
	Clb1, Clb2, Clb3, Clb4	Esenciales para mitosis: montaje del huso acromático, inactivación de la transcripción de CLN, supresión del crecimiento polarizado de la gema, represión de SBF (Fase G_2 y M).
Pho85	Pcl1, Pcl2, Clg1	Necesarias en <i>START</i> en ausencia de Cln1 y Cln2, morfogénesis.
	Pcl9	Regulador negativo de Whi5.
	Pho80	Regulador negativo de la vía PHO (metabolismo del fosfato).
	Pcl5	Regulador negativo de la biosíntesis de aminoácidos.
	Pcl6, Pcl7	Regulador positivo de la segregación cromosómica.
	Pcl8, Pcl10	Regulador negativo de la glucogeno sintasa 2 (metabolismo de azúcares).
Kin28	Ccl1	Regulador de transcripción.
Srb10	Srb11	Regulador de transcripción.
Ctk1	Ctk2	Regulador de transcripción.
Sgv1	Bur2	Regulador de transcripción.

complejo G_1/S -CDK inicia los primeros pasos del ciclo celular siendo importante la activación del siguiente complejo, S-CDK, mediante la destrucción de los inhibidores de este último complejo y la inactivación del APC/C. En la siguiente fase, mediante fosforilación de sustratos específicos, S-CDK activa la duplicación del DNA y del SPB (en levadura). Cuando la fase S está terminando se procede a un cambio de expresión a las ciclinas de la fase M, permitiendo su acumulación durante la fase G_2 . Además los complejos M-CDK se mantienen inhibidos en G_2 mediante fosforilación de la subunidad CDK [24]. Al entrar en mitosis se produce la eliminación abrupta de dicha fosforilación inhibitoria, comportando la activación del complejo M-CDK y el paso a

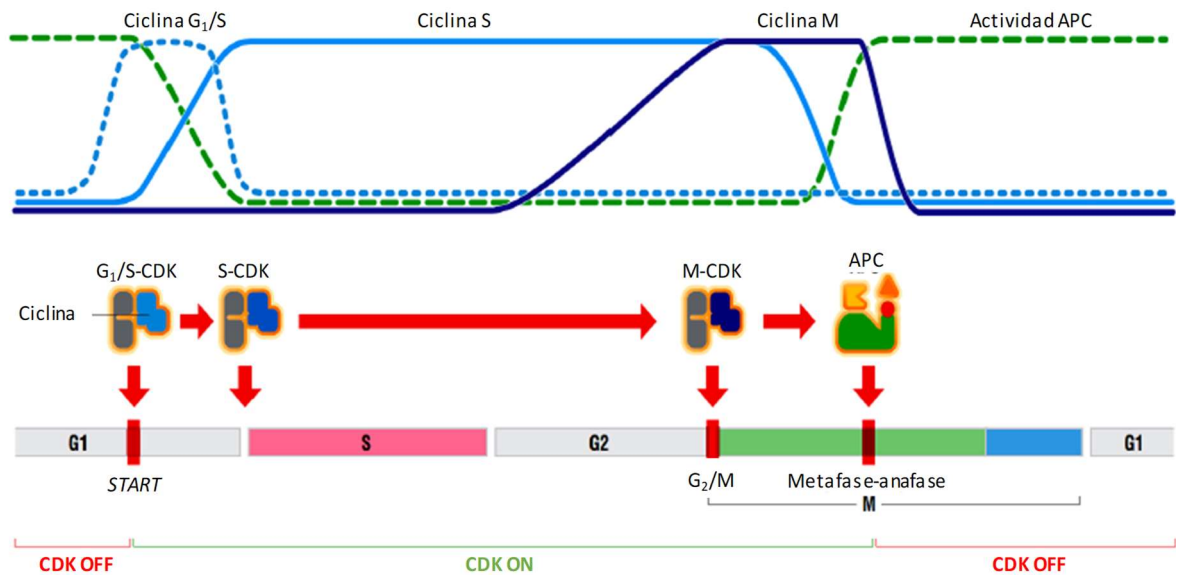


Figura 3 Esquema del sistema de control del ciclo celular

Niveles durante el ciclo celular de los tres tipos mayoritarios de ciclinas y actividad del APC/C (arriba) y oscilaciones de los complejos Ciclina/CDK a lo largo de los diferentes eventos del ciclo celular (abajo). La formación de complejos activos de G₁/S-CDK inician un nuevo ciclo de división a través de superar el *checkpoint* START. Este evento activa los complejos S-CDK que inician la replicación del DNA al inicio de la fase S. Tras completar la fase S, se activan los complejos M-CDK resultando en la entrada y progresión a través de la fase G₂/M y formación del huso mitótico. La activación del APC/C promueve la separación de las cromátidas hermanas y la traspasar la transición metafase-anafase. La actividad el APC/C causa la destrucción de las ciclinas de fase S y M y la inactivación de la CDK. La actividad del APC/C se mantiene durante G₁ hasta que la actividad G₁/S-CDK vuelve a activar un nuevo ciclo celular. Vía no aplicable a todos los seres vivos, uso como mecanismo general. Adaptado de [24]

través del *checkpoint* de G₂/M. Seguidamente este complejo activa el APC/C y, si la alineación de todos los pares de cromátidas hermanas es correcta (*checkpoint* de transición de metafase-anafase), se procede a la rotura del sistema de cohesión de la cromátidas y a la eliminación de las ciclinas de fase S y M, para permitir la salida de mitosis e iniciar el siguiente ciclo con un nivel mínimo de actividad CDK.

Los sustratos de las CDK son fosforilados en un aminoácido (aa) treonina (T) o serina (S) de una secuencia específica de las que les precede un residuo prolina (P). Es altamente favorable si se presenta un aa básico dos posiciones más allá del residuo a fosforilar: [T/S*]PX[K/R], donde T/S* indica la treonina o serina fosforilada, X representa cualquier aa, y K/R representa un aa básico tipo lisina (K) o arginina (R) [25].

CDC28: la principal CDK del ciclo celular y sus ciclinas

La principal CDK encargada de coordinar el ciclo celular en *S. cerevisiae* es Cdc28 o CDK1 [26], una proteína esencial para su viabilidad. Las ciclinas descritas para Cdc28 se clasifican en dos grupos, las ciclinas de G₁ (Cln1, Cln2, Cln3) y las ciclinas de tipo B, que se reparten a lo largo del resto de fases (Clb1, Clb2, Clb3, Clb4, Clb5 y Clb6) (Figura 4). El primer complejo en formarse en el ciclo celular durante G₁ es Cln3/Cdc28, activador de *START* [27], promoviendo la liberación por fosforilación de Whi5, un inhibidor de los factores de transcripción SBF (siglas del inglés *Swi4 cell cycle Binding Factor*) y MBF (siglas del inglés *Mlu1 cell cycle Box binding Factor*). Estos complejos regulan la expresión de decenas de genes durante la transición G₁/S [28]. De especial relevancia, los complejos SBF, formados por las proteínas Swi4 y Swi6, se encargan de la transcripción de las ciclinas *CLN1* y *CLN2*, que activaran un *feed-back* positivo e irreversible de activación de *START*, mientras que el complejo MBF, formado por las proteínas Mbp1 y Swi6, se encarga de la transcripción de *CLB5* y *CLB6* [29]. Una vez aparece el complejo Cln2/Cdc28, éste se encarga de la inactivación por fosforilación del inhibidor Sic1, liberando la actividad del complejo Clb5/Cdc28 que promueve la entrada en fase S [30] gracias a la fosforilación de

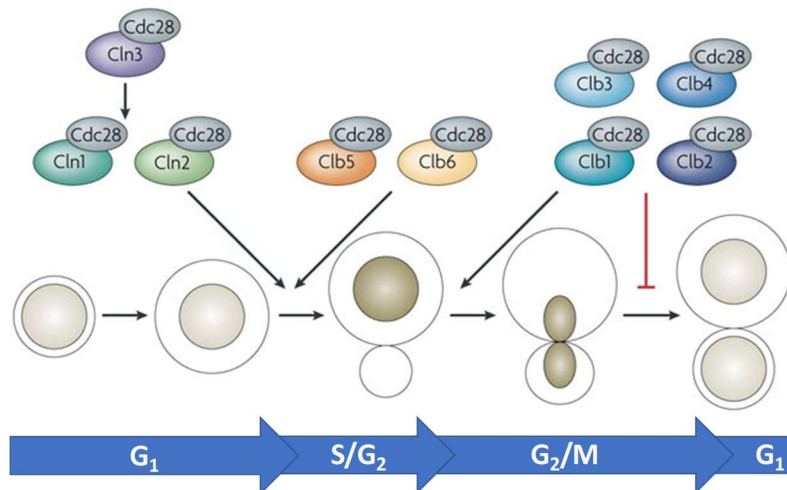


Figura 4: Ciclinas en el ciclo de *S. cerevisiae*.

Las ciclinas de levadura activan a Cdc28, para el progreso a través del ciclo celular. Las ciclinas de fase G₁ (Cln1, Cln2 y Cln3), promueven la duplicación del cuerpo polar del huso, la aparición de la gema y la activación de las ciclinas de tipo B. Las ciclinas de fase S (Clb5, Clb6) avanzan la replicación del DNA y las ciclinas de fase M (Clb1, Clb2, Clb3 y Clb4) promueven la formación del huso mitótico y el inicio de mitosis. Las ciclinas de fase M inhiben la salida de mitosis y la división celular. Finalmente, la citoquinesis genera la separación de la célula madre y la nueva célula hija y el inicio de un nuevo ciclo. Adaptada de [299].

componentes del complejo pre-replicative [31]. Durante la fase S aparecen en juego Clb3 y Clb4, implicadas en la duplicación del SPB y finalización de la replicación del DNA [32]. Finalmente, durante G₂ aparecen Clb1 y Clb2, que activan la segregación cromosómica y el crecimiento isotrópico de la gema, e inhiben eventos de G₁.

Existe otra CDK denominada Pho85, no esencial para la viabilidad celular (Tabla 1). Esta CDK multifuncional está también relacionada con la regulación del ciclo celular [33]. Entre otras actividades es importante destacar su actividad en la progresión por la fase G₁, la formación del citoesqueleto de actina, la polaridad celular, el metabolismo del fosfato y glucógeno, y la señalización de las condiciones de crecimiento [34], sobre todo en relación a la coordinación del ciclo celular y la disponibilidad de nutrientes [35]–[37].

3. Maquinaria y ejecución de START

Uno de los eventos más importante en las células de *S. cerevisiae* tiene lugar durante la fase G₁, donde se adquiere el tamaño celular suficiente o crítico, permitiendo superar el *checkpoint* conocido como *START*, momento en que las células inician un nuevo ciclo celular de forma irreversible. En esta etapa las células de levadura obtienen un tamaño suficiente como para comprometerse a completar un nuevo ciclo manteniendo las características óptimas que permitan su viabilidad y mantener un tamaño constante en la población. Por este motivo durante la fase G₁ existe una exquisita regulación entre el tamaño y el ciclo celular. Se debe considerar la regulación del tamaño celular como un complejo sistema interconectado de procesos donde convergen diferentes respuestas intrínsecas o extrínsecas de información. La coordinación y precisión entre crecimiento y ciclo celular es un problema actual en la biología fundamental, ya que probablemente se puede aplicar a todos los organismos [38]–[44].

S. cerevisiae ha sido utilizado para el estudio de los mecanismos que determinan el tamaño celular, gracias a que mantiene dos características universales en su regulación: un tamaño límite para la ejecución de *START* en la entrada al ciclo celular [19], [45] y una *ratio* masa/ploidía constante [46].

La activación de *START* (Figura 5) empieza con la activación del complejo formado por Cln3 [47]–[50], ciclina de la fase G₁, y Cdc28 [51]. Cln3/Cdc28 fosforilan al inhibidor transcripcional Whi5 (y probablemente también a Swi6) en múltiples

residuos para activar SBF y MBF [52]. Gracias a esta activación transcripcional aparecen en juego dos nuevas ciclinas de la fase G₁, Cln1 y Cln2, que conjuntamente a Cdc28 activaran un *feedback loop* positivo para la ejecución irreversible de *START* [50], [53] produciendo una ola transcripcional de aproximadamente 200 genes implicados en la siguiente etapa del ciclo celular [28].

La ciclina Cln3 se mantiene en niveles constantes durante la fase G₁ [54] y su regulación consiste en un mecanismo de retención y liberación desde del retículo endoplasmático (RE), que previene su acumulación en el núcleo [17]. Whi3, fue el primer gen identificado como regulador negativo de la actividad de Cln3 [55], el cual une su mRNA y recluta Cdc28 para retener eficientemente el complejo Cln3/Cdc28 en el RE al inicio de la fase G₁ [56]. En la etapa final de la fase G₁ la chaperona Ydj1 juega un rol esencial en la liberación de Cln3 o del complejo Cln3/Cdc28 presente en el RE, que permite su acumulación en el núcleo y el inicio de *START* [57]. Junto con otras chaperonas multifuncionales de la levadura de gemación, Ydj1 tiene además roles muy importantes en otros procesos celulares, como la translocación de proteínas al lumen del RE un proceso clave en el crecimiento celular. Este sistema de regulación abre actualmente novedosas líneas de investigación e interesantes avances en el complejo sistema molecular por el que se regula. Recientemente, el estudio con formas de Cdc28 mutantes, presentes en células de tamaño reducido llamada Cdc28^{wee} han permitido el descubrimiento de nuevos reguladores de este sistema

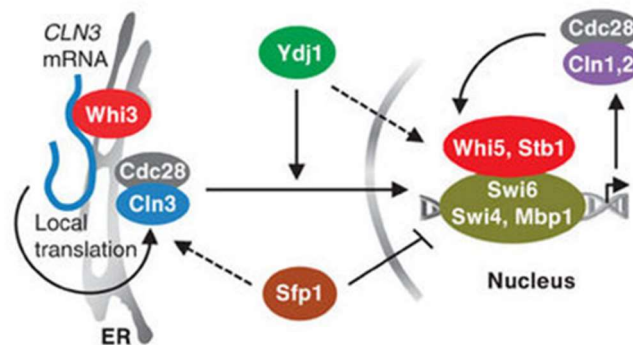


Figura 5: Esquema molecular de la activación de *START*

El complejo Cln3/Cdc28 es transportado al núcleo donde fosforila al represor Whi5. Los factores de transcripción MBF y SBF son liberados para iniciar la transcripción del regulón G₁/S e inicio del ciclo celular. Whi3 y Ydj1 actúan como reguladores, negativo y positivo respectivamente, sobre la liberación del complejo Cln3/Cdc28 del RE y su acumulación en el núcleo. Cln1 y Cln2 actúan positivamente para generar una activación robusta y coherente de los factores MBF y SBF. Esquema adaptado de [57].

como es Whi7 [58], parólogo de Whi5, que permite establecer un *feedback loop* positivo sobre la liberación del complejo Cln3/Cdc28 y Whi8, una proteína de unión a RNA, como la anterior, que se presenta en gránulos de estrés y en los llamados *P-bodies*, que permitiría la retención del mRNA de *CLN3* (trabajo actualmente en proceso de elaboración).

Regulón G₁/S

El regulón G₁/S es un grupo de más de 200 genes que son activados transcripcionalmente como consecuencia de la ejecución de *START* [28], muchos de ellos directamente relacionados con la progresión del ciclo celular [59], [60]. Este regulón se controla por dos factores de transcripción con componentes de unión al DNA únicos, Swi4 (SBF) o Mbp1 (MBF) que contienen en común Swi6, que actúa como un cofactor de transcripción.

El lugar de unión para MBF también es llamado caja del ciclo celular Mlu (o MCB, de sus siglas en inglés *Mlu Cell cycle Box*) ya que presenta un lugar de restricción para la enzima *MluI*, y en el caso de SBF también llamado caja del ciclo celular Swi4 (o SCB, de sus siglas en inglés *Swi4 Cell cycle Box*). Los genes que son diana de SBF y MBF han sido tradicionalmente definidos por la presencia redundante de secuencias SCB y MCB en sus promotores. Los genes diana de SBF y MBF son funcionalmente diferentes. Los genes diana de SBF están relacionados con la morfogénesis celular, la formación del huso y su duplicación, y el crecimiento celular como *CLN1*, *CLN2*, *FKS1*, *FKS2*, *GIN4*, *PCL1*, *PCL2*. En cambio, MBF activa la transcripción de genes relacionados con el control o ejecución de la replicación y reparación del DNA como *CDC2*, *CLB5*, *CLB6*, *POL2*, *RNR1* [61]–[63].

4. Regulación del sistema de control por degradación por ubiquitinación

Para establecer un funcionamiento correcto del sistema de control del ciclo celular, que permita una transición unidireccional y de forma irreversible de una fase a la siguiente en el ciclo celular, hay que separar dos funciones esenciales para su correcta actividad: la activación irreversible de los complejos con actividad CDK y, por otro lado, la destrucción de los elementos de regulación mediante proteólisis. Esta actividad de proteólisis es de gran relevancia durante la fase M, especialmente en la transición metafase-anafase, donde está implicada en la separación de cromátidas y la destrucción de las ciclinas de esta fase. Esta destrucción de ciclinas permite

finalmente alcanzar un estado de baja actividad CDK durante G₁. Por otra parte, la proteólisis también tiene importancia en la etapa final de la fase G₁ donde se elimina el inhibidor de CDK Sic1, promoviendo así una activación irreversible de los complejos S-CDK y la entrada en fase S.

Esta proteólisis selectiva de elementos reguladores del ciclo celular se da mediante la señalización por ubiquitinación [64], que consiste en el marcaje con múltiples repeticiones de una pequeña proteína llamada ubiquitina. Las proteínas marcadas son reconocidas y destruidas por grandes complejos llamados proteosomas.

El proceso de ubiquitinación depende de tres elementos, llamados E1, E2 y E3, que forman una cadena de transporte de la ubiquitina hasta su sustrato final (Figura 6). El primer paso es la activación de la ubiquitina mediante la unión covalente de su extremo C-terminal a los grupos sulfhidrilos del aa cisteína, mediante el gasto de ATP, presente en el lugar activo de la enzima ubiquitin-activadora (E1). Esta ubiquitina activada es transferida a la enzima ubiquitin-conjugadora (E2) mediante transesterificación. Seguidamente E2 conecta con la enzima ubiquitin-ligasa (E3) que cataliza la formación de un puente isopeptídico entre el grupo lisina presente en el sustrato final y el grupo C-terminal de la ubiquitina [65], [66]. Finalmente, la repetición sucesiva de esta reacción conlleva a la aparición de cadenas de ubiquitinas, ya que la E3 permite catalizar sucesivas transferencias de moléculas ubiquitina, lisinas de la

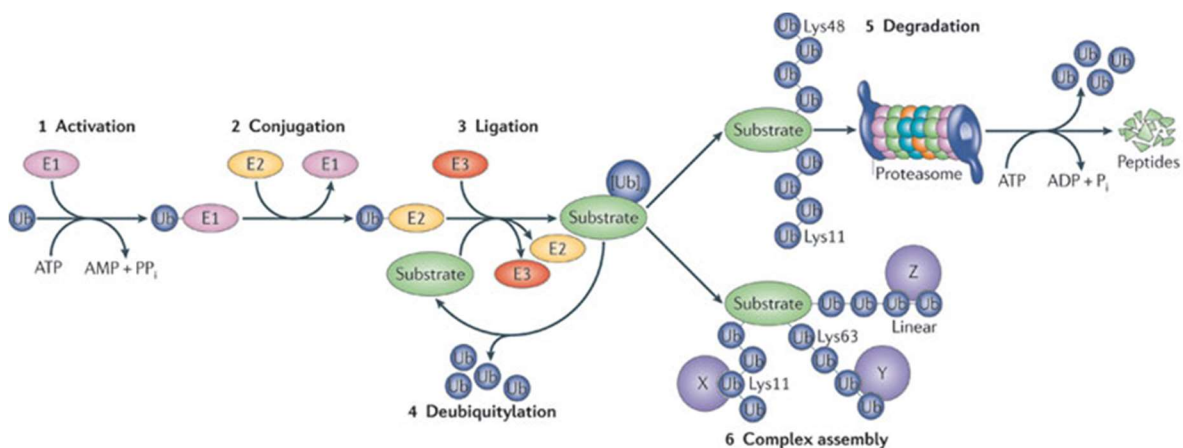


Figura 6: Esquema molecular simplificado del sistema de ubiquitinación

La vía se inicia tras la activación de la ubiquitina (Ub) a través del gasto energético de ATP y unión a la ubiquitin ligasa (E1). La Ub es transportada a la ubiquitin conjugadora (E2) que se encarga mediante su unión a la ubiquitin ligadora (E3) de transferir la Ub al sustrato final que determina E3. Que puede ser degradado por el proteosoma o usado en otros procesos. Adaptado de [300].

ubiquitina ya unida al sustrato, resultando sustratos poliubiquitinados en múltiples lisinas. Estos son detectados por el proteosoma y degradados mediante proteólisis. Se debe indicar que la topología final generada por estas cadenas, incluyendo la monoubiquitinación, no únicamente establece su degradación, sino que se han descrito estructuras que actúan en funciones tan importantes y distintas como la transducción de señales, la reparación de DNA, endocitosis, gemación, y exporte nuclear, entre otras [67].

En eucariotas pluricelulares este sistema de conjugación mantiene una alta conservación funcional, pudiendo encontrar de una a dos E1 (1 en levadura), múltiples E2 (11 en levadura) y una larga familia de E3 (60-100 en levadura). Esta última media la exquisita selectividad de ubiquitinación por su interacción directa con los sustratos [68].

El complejo SCF

Los complejos SCF (siglas del inglés, *Skp1–Cullin–F-box protein*) forman una gran familia de ubiquitin-ligasas que regulan un amplio espectro de proteínas relacionadas con el ciclo celular, la transcripción y procesos de transducción de señales [69]–[71].

En *S. cerevisiae*, el complejo SCF está compuesto de diferentes subunidades (Figura 7A): Skp1, un adaptador que permite unirse a una gran variedad de proteínas que contienen el motivo llamado caja F o *F-box* [72], [73]; Cdc53 componente de la familia de proteínas tipo *cullin*, proteína que forma el andamiaje o matriz del complejo encargada de reclutar la proteína Cdc34 con Skp1 [74]–[76]; Cdc34, enzima ubiquitin-conjugadora (E2) que cataliza la transferencia de ubiquitinas activadas a la proteína diana [73], [77], [78]; Hrt1, proteína que estimula la actividad ubiquitin-ligasa gracias al dominio RING-H2 [78], [79] y finalmente, incluyendo a este complejo se encuentra otra subunidad variable entre un gran grupo de proteínas que presentan el motivo *F-box*, el cual se une a Skp1, y que incluyen Cdc4, Dia2, Grr1, Met30, Saf1. Dichas subunidades tienen como función principal dotar de especificidad al complejo detectando los sustratos multifosforilados que serán diana del complejo SCF [71], [76], [80].

INTRODUCCIÓN

El complejo SCF promueve y participa sobre todo en la transición G₁/S, especialmente mediante las proteínas *F-box* Cdc4 (Figura 7B) y Grr1 (Figura 7C), que a su vez participan en la ubiquitinación y degradación de ciclinas de G₁: Cln1, Cln2 y Cln3 [75], [81], [82]; la ciclina de fase S, Clb6 [83]; los inhibidores de CDK Sic1 y Far1 [73], [84]–[86]; y también proteínas encargadas de la replicación del DNA como Cdc6 [87], [88]. SCF también está implicada en la degradación de Swe1 durante la transición G₂/M [89]. El complejo SCF se encuentra de forma activa a lo largo de todo el ciclo y la degradación de sus sustratos depende, principalmente, del nivel de fosforilación que presentan en muchos casos directamente mediado por la actividad CDK [90].

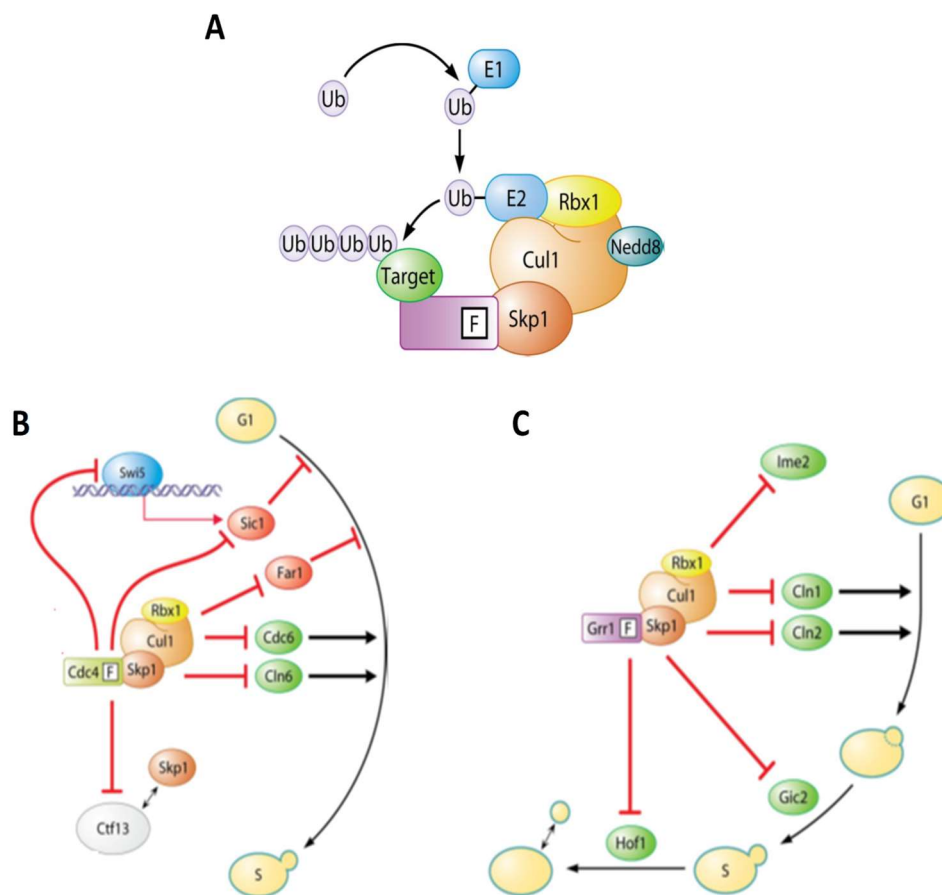


Figura 7: Componentes del SCF y regulación del ciclo celular

Esquema simplificado del complejo SCF (A), donde se indican sus componentes y proceso de ubiquitinación del sustrato (*target*) final. Principales sustratos regulados por las proteínas *F-Box* Cdc4 (B) y Grr1 (C) que participan en eventos del ciclo celular. Adaptado de [301].

El complejo APC/C

El APC o ciclosoma (APC/C) es una ubiquitin ligasa compuesta por múltiples subunidades tipo *cullin-RING E3* (Figura 8A) que regula la progresión por la fase M y el establecimiento de la fase G₁ (Figura 8B) [91]–[93]. En *S. cerevisiae* regula la transición metafase/anafase y la salida de mitosis a G₁ mediante la ubiquitinación de sustratos como las ciclinas de fase M, los inhibidores de separación de cromátidas Pds1 (Securina), proteínas motoras como Kip1 y Cin8, quinasas del tipo polo/Cdc5 y factores de disociación como Ase1 [94]–[97].

La estructura del complejo del APC/C no se conoce bien actualmente, especialmente en la estequiometría y el peso molecular del complejo y del núcleo catalítico. En *S. cerevisiae* se conocen 13 genes que forman este núcleo, que están altamente conservados en otros eucariotas y que son esenciales para la actividad del complejo que transcriben para las siguientes proteínas: Apc1, Apc2, Apc4, Apc5, Apc9, Apc11, Cdc16, Cdc23, Cdc26, Cdc27, Doc1, Mnd2 y Swm1 [98]. Este complejo precisa, además, de otras subunidades activadoras: Cdc20, Cdh1 y Ama1; y pueden estar presentes otros componentes con actividad de inhibición del APC/C: Mad2, Mad3 (BubR1), Bub3 y Acm1.

Los activadores Cdc20 y Cdh1 son particularmente importantes en la regulación de la actividad del complejo APC/C sobre los diferentes sustratos ya que le dotan la especificidad del complejo [99]. Cdc20 activa el APC/C durante la transición metafase-anafase permitiendo la separación de cromátidas e iniciar la salida de mitosis. Los niveles de Cdc20 están regulados cíclicamente, se acumulan durante la fase S gracias a la regulación transcripcional de las ciclinas Clb o de tipo B, y finalmente cesan su actividad por degradación a partir de la salida de mitosis y durante la fase G₁ por el complejo APC^{Cdh1} [100], [101]. Durante la metafase las subunidades del núcleo del APC/C son fosforiladas gracias a la actividad M-CDK y también por la quinasa Cdc5 [102], permitiendo la unión de Cdc20 al complejo. APC^{Cdc20} ejecuta la degradación de Pds1 y las ciclinas de fase M, reduciendo la actividad de los complejos M-CDK. Los complejos M-CDK inician una cadena de eventos que conlleva a un *feedback* negativo hasta su propia destrucción. Gracias a que la activación del APC^{Cdc20} depende de la fosforilación por M-CDK, la reducción cooperativa entre ambos conlleva a la disociación final de Cdc20 y la inactivación del APC^{Cdc20}. Así, ambos complejos APC^{Cdc20} y M-CDK conllevan a su propia inactivación durante el final de mitosis.

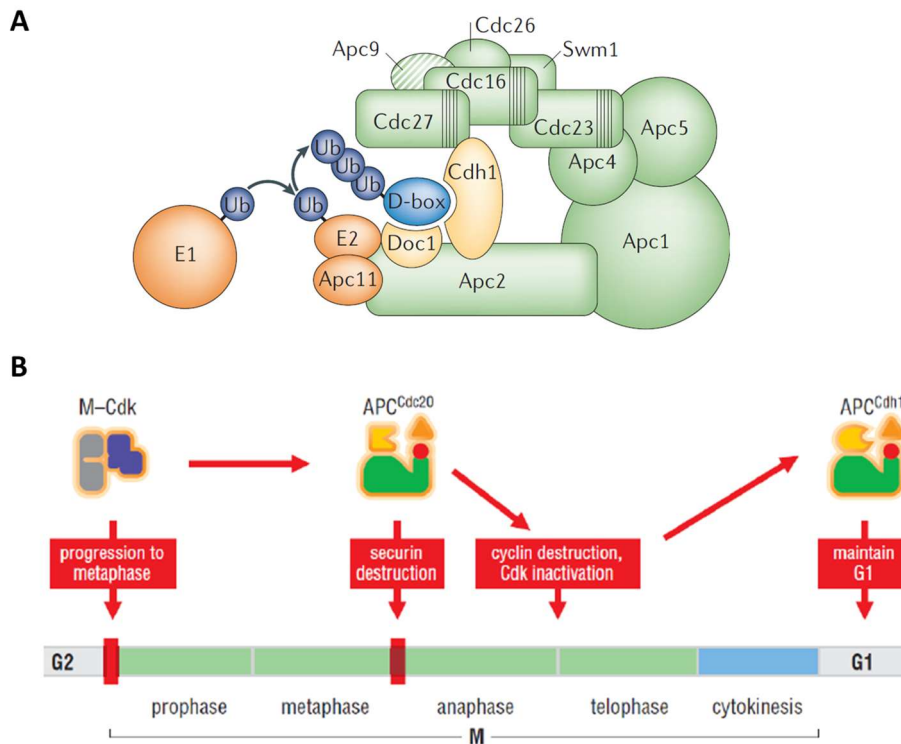


Figura 8: Componentes del APC/C y regulación del ciclo celular

Esquema simplificado del complejo APC/C (A), donde se indican sus componentes y proceso de ubiquitinación del sustrato (*D-Box*) final, siendo Cdh1 intercambiable por Cdc20. Adaptado de [92]. Actividad del complejo APC/C a lo largo del ciclo (B). La actividad de los complejos M-CDK promueven la activación de APC^{Cdc20}, que inicia la anafase y salida de mitosis mediante la destrucción de proteínas reguladores como las ciclinas que gobiernan la fase M y la securina. La destrucción de las ciclinas y la inactivación de CDK permite la activación de APC^{Cdh1} complejo que mantiene la fase G₁. Adaptado de [24].

Como se ha sugerido anteriormente, Cdh1 es otro activador del APC/C, a la vez que homólogo de Cdc20 pero que tiene actividad durante la fase final de mitosis y durante los eventos tempranos de la fase G₁. Su función durante el ciclo es mantener una elevada tasa de destrucción de ciclinas antes de la entrada a un nuevo ciclo celular [99], [103]. Una diferencia clave con Cdc20 es que no es dependiente de la fosforilación de los componentes del APC/C para su unión. Cdh1 se expresa a lo largo de todo el ciclo celular y se mantiene inactiva por la fosforilación dependiente de los complejos S-CDK y M-CDK desde la fase S hasta la mitosis. La activación del complejo APC^{Cdh1} tiene lugar cuando la actividad CDK ha disminuido suficientemente por el complejo APC^{Cdc20} durante la transición metafase/anafase, donde Cdh1 será defosforilado por Cdc14 tras la activación del sistema de salida mitótica (o MEN, de las siglas en inglés *Mitotic Exit Network*) [104]. La actividad del APC^{Cdh1} se mantiene

intensa durante la fase G₁, asegurando la destrucción de las ciclinas de fase S y fase M, que se mantiene hasta que la célula no está preparada para iniciar un nuevo ciclo celular. Las ciclinas de G₁/S no son reconocidas por el complejo APC^{Cdh1}, actividad que a final de la fase G₁ conlleva la fosforilación de Cdh1 e inactiva el complejo APC/C hasta la metafase [93].

5. Regulación del sistema de control por el centrómero

El centrómero dirige la segregación cromosómica asegurando su correcta distribución en las células hijas y su supervivencia en una nueva generación, y en él se establece el llamado cinetocoro, una macro-estructura compuesta por múltiples complejos proteínicos que aseguran la correcta segregación mediante la unión de los cromosomas a los microtúbulos conectados a los cuerpos polares del huso. Este complejo sistema además tiene una gran importancia en la regulación del ciclo celular ya que, dependiendo de los elementos presentes en él, se ejecutan mecanismos que permiten asegurar la correcta segregación de las cromátidas hermanas en la transición metafase/anafase.

El centrómero

El centrómero es la región del cromosoma para el establecimiento de la unión del cuerpo polar del huso a los cromosomas. En sistemas eucariotas unicelulares, como es el caso de la levadura *S. cerevisiae*, el centrómero es puntual y está definido por una secuencia de DNA que se encuentra en los cromosomas. En el caso de organismos más complejos, el centrómero no está definido por una secuencia puntual, sino que lo hacen a través de largos centrómeros regionales definidos por diferentes repeticiones de DNA satélite (Figura 9). El DNA centromérico de *S. cerevisiae* fue uno de los primeros en ser aislado [105] y está formado por tres secuencias de DNA comunes en todos los cromosomas [106]. Son los llamados elementos del DNA centromérico I (CDEI, de las siglas en inglés *Centromeric DNA Element I*), CDEII y CDEIII. Todos ellos con una secuencia entre 116-120pb, suficientes para dotar de estabilidad mitótica cuando son introducidos en plásmidos [105], [107], [108]. El CDEI está formado por 8pb con la secuencia consenso (PuTCACPuTG); el CDEII es una región de 78-86pb ricas en adenina y timina y la región CDEIII está formada por 26pb

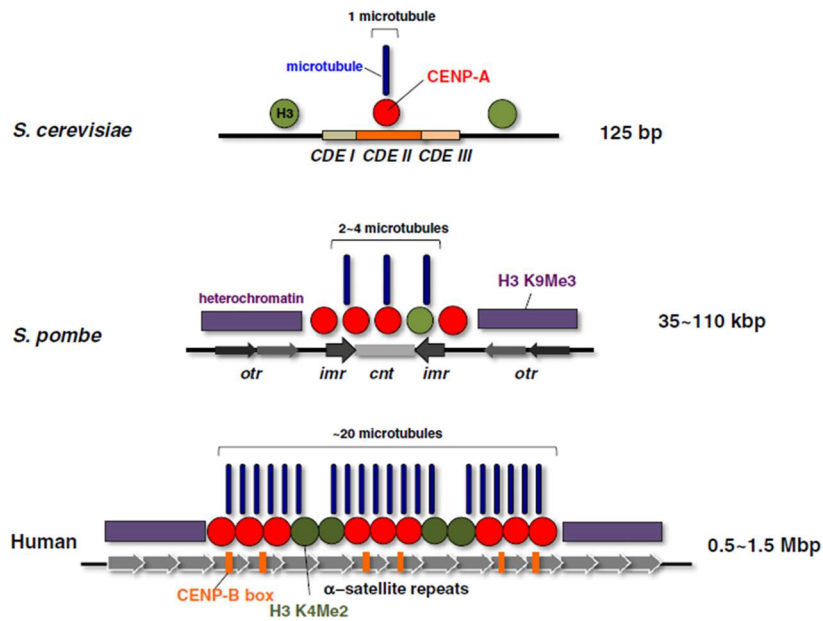


Figura 9: Diversidad de la estructural de los centrómeros

Esquema del centrómero en *S. cerevisiae*, *S. pombe* y humanos. Se indica la capacidad numérica de unión a microtúbulos a los centrómeros, su tamaño y los principales elementos que forman la cromatina centromérica en las diferentes especies. Adaptado de [302].

con la secuencia consenso (TGTTT(T/A)TGNTTTCCGAAANNNA), que contiene una secuencia interna de 7 nucleótidos invariables [109]. Este tipo de centrómeros son llamados centrómeros puntuales ya que son pequeños y unen un único microtúbulo por cromosoma.

El cinetocoro

El cinetocoro se define como la macroestructura proteínica que se establece sobre el DNA centromérico, un sistema compuesto de múltiples complejos que varían durante el ciclo con función de interconectar el centrómero y los microtúbulos procedentes de los SPBs (Figura 10). Esta estructura tiene como finalidad permitir la segregación de las cromátidas hermanas en un correcto espacio de tiempo y coordinado con el ciclo celular, por lo que los complejos que aparecen en ella tienen funciones de regulación del ciclo celular, detección de errores en la segregación y unión de microtúbulos, y un papel estructural y motor durante la separación de las cromátidas. El cinetocoro muestra una organización en capas, con una gran complejidad, y en el caso de la levadura la mitad de estos elementos están codificados por genes esenciales y muestran homólogos en toda la escala evolutiva [110].

En *S. cerevisiae* los complejos se pueden clasificar por la porción que ocupan dentro del centrómero en tres tipos: internos, centrales o medios, y externos. El complejo DAM1 (de las siglas en inglés, *Duo1- And Mps1 (monopolar spindle 1)*), presente en el cinetocoro externo, se regula bajo la fosforilación por la quinasa Ipl1, y juega un papel crucial en la mediación de los microtúbulos con el cinetocoro. Este complejo interactúa físicamente con proteínas del complejo del centrómero interno CBF3 (siglas del inglés, *Centromere binding factor 3*), y complejos del centrómero medio, CFT19 y Ndc80, y además se une a los microtúbulos [111], [112]. El complejo Ipl1, localizado en el centrómero medio, responde a pérdidas en la tensión en la unión monoalélica y actúa para resolver estas uniones inapropiadas [113]–[115]. Ipl1 incrementa el intercambio de conexiones de los microtúbulos con el cinetocoro, para facilitar la bi-orientación final de los cromosomas [112], [115], [116], y está implicada en la regulación del ensamblaje del complejo DAM1 [115]. En el cinetocoro central se encuentra también el complejo MTW1 que participa en la biorientación del cinetocoro monitorizado por la quinasa Ipl1 [117] y el complejo Spc105 (también conocidos como Blinquina, Spc7 o KNL1) [118], con importantes funciones en la activación del SAC (ver más adelante) [119]–[122]. El conjunto de los complejos Ndc80, MTW1 y Spc105, es conocido como el sistema KMN, que tiene como función interaccionar con el extremo del microtúbulo y establecer una unión estable [123], [124]. Y finalmente,

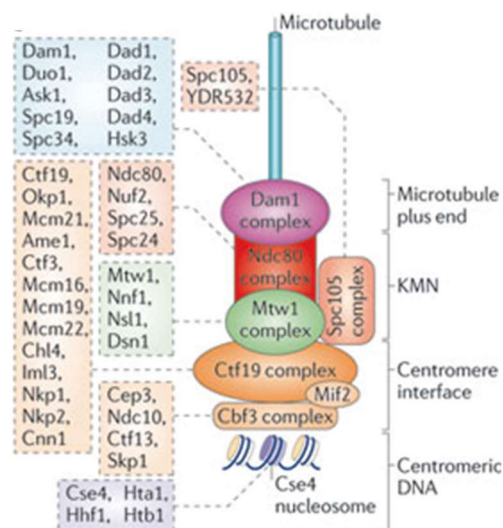


Figura 10: El cinetocoro y sus componentes

El cinetocoro es un complejo proteico que permite la conexión entre el DNA centromérico y los microtúbulos procedentes del huso mitótico. Este compuesto por múltiples complejos, se indican los diferentes elementos que los forman. Estos pueden ser clasificados en la posición del cinetocoro que ocupan: interno (*centromere interface*), medio (KMN) o exterior (*Microtubule plus end*). Estos varían a lo largo del ciclo celular. Adaptado de [124].

indicar que el complejo más crítico es CBF3 [125], que consiste en las proteínas esenciales Ndc10, Cep3, Cft13 y Skp1, requeridas todas ellas para la formación del cinetocoro sobre cada uno de los centrómeros, permitiendo la conexión DNA/cinetocoro.

Sobre los elementos del DNA centromérico que se definen en el apartado anterior, se observa que en CDEI se establece la unión de la proteína Cbf1, una proteína *helix-turn-helix*, factor de transcripción que se une en otros lugares del genoma pero que aunque aun no siendo esencial contribuye a la función del cinetocoro [126]–[128]. En el CDEIII se da lugar la unión al complejo interno del centrómero, CBF3, a través de un motivo conservado CCG esencial para la función del centrómero [129], [130]. A lo largo de los tres elementos se observa la aparición del generalmente llamado CenH3, en levadura Cse4, que intercambia la histona H3 en los nucleosomas centroméricos. Cse4 permite el adecuado establecimiento del cinetocoro, la unión a los microtúbulos y la segregación cromosómica correcta, siendo su regulación un importante evento durante la formación del cinetocoro [131], [132].

EI SAC

El SAC (de las siglas en inglés, *Spindle-Assembly Checkpoint*) es el mecanismo de supervivencia por el que la mayoría de las células eucariotas evitan la separación de las cromátidas hermanas cuando los SPBs están dañados o cuando los cromosomas no están correctamente bi-orientados en el huso mitótico [133]–[136]. Este mecanismo también fue descubierto en *S. cerevisiae* en dos trabajos independientes de *screening* en 1991 mediante la aplicación de productos que dañan la formación de los microtúbulos de los husos mitóticos, permitiendo determinar los principales elementos que regulan este sistema gracias a la aparición de mutantes que evitaban la detención durante la mitosis [137], [138]. Los genes encontrados implicados fueron los llamados MAD (de las siglas en inglés, *Mitotic-Arrest Deficient*): *MAD1*, *MAD2*, *MAD3* (*BUBR1* en humanos) y los llamados BUB (de las siglas en inglés, *Budding Uninhibited by Benzimidazolane*). Conservados en todos los eucariotas, evitan la separación precoz de cromátidas hermanas durante la mitosis [139], [140].

La finalidad principal del SAC es inhibir a Cdc20, cofactor del APC/C [141]. Específicamente, el SAC impide que Cdc20 active el APC/C y éste active la degradación de ciclinas de fase M y Pds1 (o securina). La securina es un inhibidor

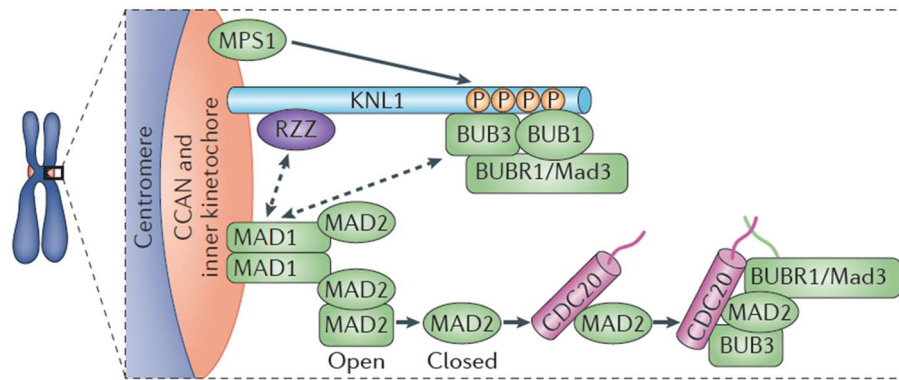


Figura 11: Activación del SAC

Visión esquemática de los elementos de activación del SAC en los cinetocoros y formación del MCC, inhibidor del APC/C. En los centrómeros donde no existe una unión a los microtúbulos del huso mitótico, se inicia la fosforilación de KNL1 (o Spc105 en levadura) por parte de Mps1. Este evento recluta a Bub1 y Bub3 hacia el cinetocoro, y a su vez a BUBR1/Mad3. Estas a su vez reclutan a los heterodímeros Mad1/Mad2 (forma cerrada o *closed*), que catalizan el cambio de la forma soluble Mad2, abierta (*open*) a cerrada (*closed*). Mad2 cerrada se une a Cdc20 y recluta BUBR1/Mad3 conjuntamente a Bub3 formando el complejo llamado MCC. Adaptado de [289].

de Esp1 (o separasa), enzima que corta a Scc1 (o cohesina), la cual une las cromátidas hermanas.

En *S. cerevisiae* únicamente son necesarios dos complejos del cinetocoro para la función del SAC: CBF3 y Ndc80 [142], [143]. Aunque actualmente se desconoce la naturaleza exacta de cómo los cinetocoros pueden determinar una orientación anómala en el huso acromático, se barajan dos posibilidades: una ausencia de tensión entre cinetocoros hermanos [144], o la misma falta de unión de los microtúbulos [145].

MCC, efector del SAC

El SAC cataliza la formación de un complejo inhibidor de Cdc20 llamado MCC (de las siglas en inglés, *Mitotic Checkpoint Complex*), un heterotetrámero compuesto por: Cdc20, Mad2, BUBR1/Mad3 y Bub3 (Figura 11) [146]. Este complejo no requiere aparentemente de la aparición de los cinetocoros dada su presencia en la interfase cuando carece de un cinetocoro funcional [146]–[149]. La inhibición de Cdc20 tiene lugar de tres formas: BUBR1/Mad3 se une a Cdc20 para bloquear su dominio *D-Box* [150], [151] mediante las llamadas cajas KEN de BUBR1/Mad3 [152], [153], evita la unión de Cdc20 al complejo APC/C [154], y promueve la autoubiquitinación de Cdc20 (Figura 12A, 12B) [155]–[157].

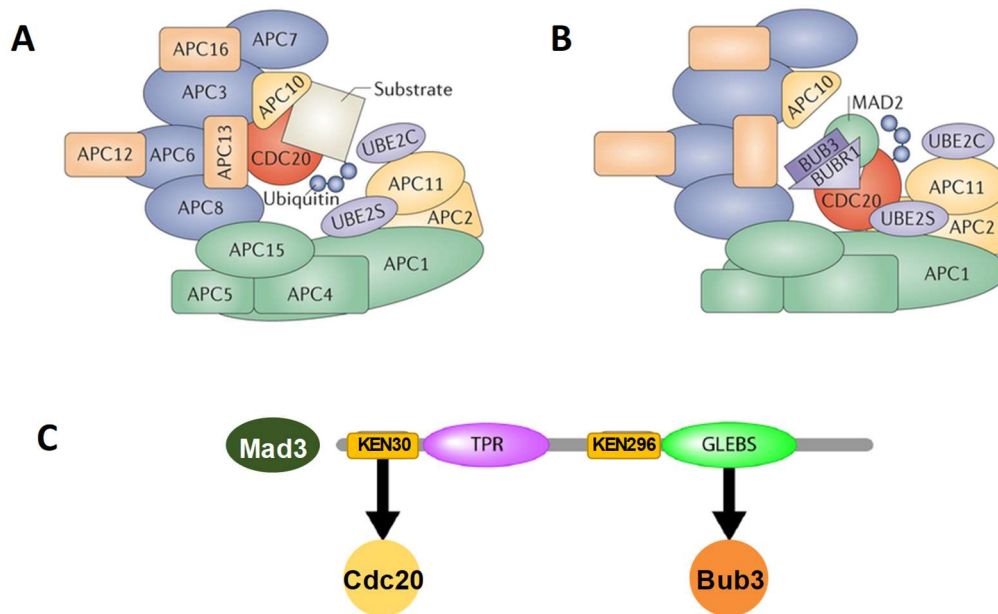


Figura 12: MCC inhibe la actividad APC/C

Esquema simplificado de los elementos del APC/C en eucariotas superiores. Durante la actividad del SAC el CDC20 es incapaz de interactuar con el APC/C para forma el complejo APC^{Cdc20} (A) y es desplazado por el complejo MCC, formado por BUBR1/Mad3, MAD2, BUB3 y CDC20 (B). Este complejo promueve un cambio conformacional del APC/C permitiendo la ubiquitinación de CDC20 y degradación mientras el SAC se encuentra activo. En la unión del MCC están implicados los motivos *D-box* y KEN. Adaptado de [303]. Estructura simplificada de Mad3 (*S. cerevisiae*) donde se indican las zonas de interacción con Cdc20 y Bub3 (C).

Mad3 en *S. cerevisiae* se diferencia de Bub1, en que el primero no presenta el dominio quinasa, que se mantiene en organismos superiores. Este es un aspecto importante ya que cuando se habla de BUBR1 en otros organismos sí que lo presenta. En su estructura (Figura 12C), se encuentran dos motivos KEN (30 y 296, según su posición en aa), el segundo con una secuencia *D-box* adyacente [153] lo que hace de Mad3 un pseudosubstrato de Cdc20 [151], [158]. Mad3 presenta además un motivo GLEBS o dominio de unión a Bub3 [159]–[162] y cerca de este último una extensión en hélice que permite la dimerización con Bub1 y la localización al cinetocoro [159].

Otro elemento clave en la señalización por el SAC en el cinetocoro es la formación de complejos Mad2-Cdc20 [163]. Mad2 existe en dos formas, la llamada cerrada (Mad2-C) o abierta (Mad2-O), y éstas dependen de la unión a Mad1, que se une a Mad2 en el cinetocoro y cataliza el paso rápido de la forma Mad2-O a Mad2-C. Esta reacción dependiente del cinetocoro promueve la interacción de Cdc20 con Mad2-C [163], [164]. Ambos mecanismos, BUBR1/Mad3 [165] y Mad2 [166],

incluyendo la fosforilación de Cdc20 por la quinasa Bub1, [167] permiten establecer un sistema robusto para el establecimiento del SAC.

En ausencia de unión entre el cinetocoro y los microtúbulos, la quinasa Mps1 actúa como iniciador de la activación del SAC [168]–[171]. La fosforilación de esta quinasa sobre Spc105, en los motivos MELT [172] da lugar a lugares de unión al heterodímero Bub1/Bub3 [120], [121]. De esta forma se recluta Bub1 al cinetocoro lo que permitiría el posterior reclutamiento de los elementos del SAC Bub3, BUBR1/Mad3 [173], [174] y quizás Mad1.

6. Regulación del tamaño celular

Existe una íntima relación entre la forma y la función en los organismos vivos [175]. Una de las características más importantes en la forma celular es el tamaño, que permite determinar la *ratio* superficie/volumen para una mejor adaptación a los ambientes donde los nutrientes y su transporte pueden ser limitantes. El tamaño celular es una de las características adaptativas que más impacto e influencia tiene en la fisiología celular a lo largo de todas las especies vivas [176].

El tamaño celular afecta a la arquitectura interna de la célula y al volumen de diferentes orgánulos y su proporción [177], y se adapta al contenido de DNA en una correlación lineal [178]. Ahora bien, aún se desconoce el mecanismo por el cual las células pueden regular el tamaño en función de la dotación genética. Los principales estudios en la regulación del tamaño celular se basan en nuestro modelo de trabajo, *S. cerevisiae*, y también en *S. pombe* ya que permiten analizar el tamaño celular bajo unas formas geométricas más simples que en células eucariotas pluricelulares. Los estudios en estos sistemas unicelulares han permitido obtener evidencias convincentes de la existencia de un mecanismo activo de regulación del tamaño celular, en que tiene lugar una correlación entre el crecimiento y la división celular [19], [179], [180]. En levaduras de gemación, el tamaño afecta la duración de la fase G₁, retrasando el momento de iniciar la replicación y la gemación si células inician el ciclo con un tamaño menor. En la levadura de fisión se observa un retraso en mitosis antes de alcanzar un tamaño celular característico [181]. Los leucocitos de mamíferos han de alcanzar una tasa específica de crecimiento y las células epiteliales necesitan crecer hasta alcanzar cierto tamaño antes de proceder a la entrada en el ciclo celular [182]–[184].

Regulación del tamaño celular en *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae*, el tamaño celular se determina durante G_1 y está influenciado por múltiples factores extrínsecos e intrínsecos (Figura 13). Los estudios en células individuales han permitido observar como las células pequeñas dedican un mayor tiempo en crecer en G_1 que las inicialmente más grandes [19], por lo que se estableció el concepto de tamaño crítico como condición a superar para ejecutar la transición G_1 -S [185]. La asimetría de la división de las levaduras de gemación tiene una implicación importante sobre el control del tamaño. La célula hija nace con un tamaño menor al de la célula madre, y debe crecer hasta alcanzar el tamaño crítico para iniciar su ciclo celular. En cambio, al haber alcanzado su tamaño crítico en el ciclo anterior, la célula madre puede iniciar la gemación a intervalos regulares en ciclos sucesivos sin necesidad de crecer [45], [186]. Esta diferencia ha sido relacionada con la distribución asimétrica de los factores de transcripción Ace2 y Ash1, que regulan la transcripción de la ciclina de G_1 Cln3 específicamente en células hijas [187]–[191].

De los reguladores de *START*, Whi5 es el que ha recibido las pruebas más claras de su papel en el control del tamaño celular. Este inhibidor de la transcripción G_1 /S se sintetiza preferentemente durante la mitosis del ciclo anterior de forma independiente al tamaño de la célula, y se diluye por aumento del volumen celular durante el crecimiento en G_1 hasta un umbral mínimo que permite la activación del regulón G_1 /S [192]. De este modo, Whi5 podría “medir” el incremento de tamaño que tiene lugar en G_1 y participar decisivamente en establecer el tamaño crítico de *START*.

La participación de Cln3 en el control del tamaño celular está muy consolidada desde hace tiempo entre los investigadores del ciclo celular de la levadura de gemación [48], [193], [194], y existe una dependencia inversa del tamaño celular con los niveles del complejo Cln3/Cdc28 [53], [195]. Cln3 es un activador dosis-dependiente de la transición G_1 /S o *START* [192], [196] y, a diferencia de otras ciclinas, su expresión oscila muy ligeramente [54], [190], [197], siendo una proteína altamente inestable, con una vida media de 5 minutos [48], [49], [54], [197].

Ahora bien, la relación entre el mecanismo de activación de Cln3 y el tamaño crítico es todavía una incógnita. Entre las hipótesis planteadas se ha propuesto que el crecimiento durante G_1 podría alterar la disponibilidad de chaperonas como Ydj1 y, así, facilitar la eventual liberación de Cln3 del RE y su acumulación en el núcleo para activar *START* [17].

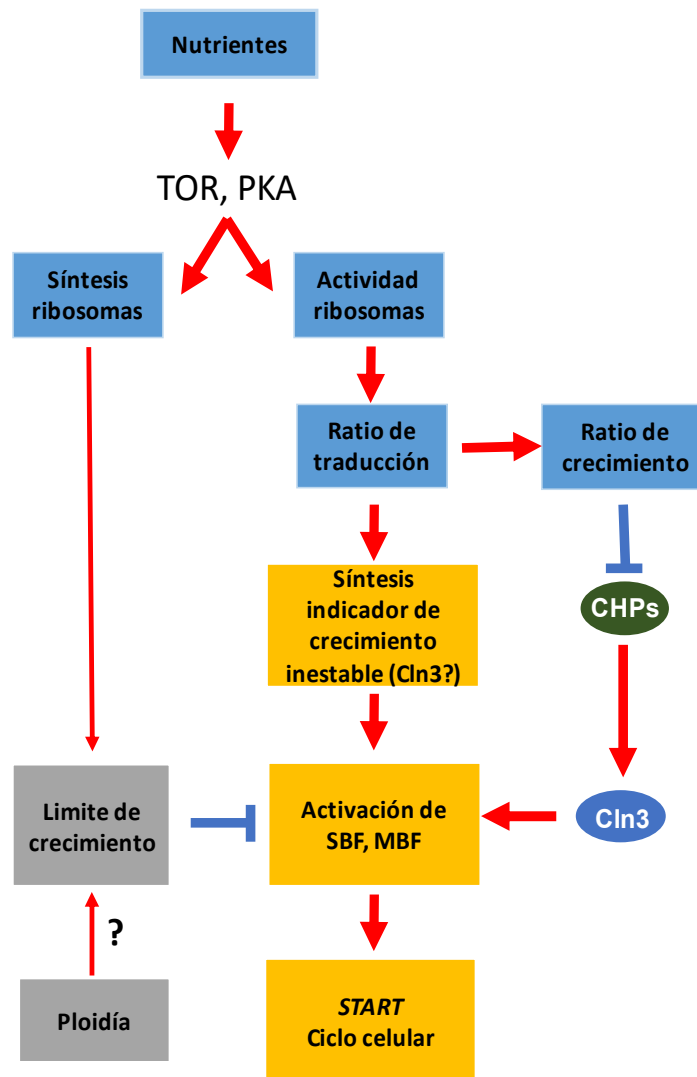


Figura 13: Posibles mecanismo de conexión entre tamaño y ciclo celular.

Resumen especulativo sobre los mecanismos que influyen el ciclo celular dependiente del tamaño. Los nutrientes estimulan el crecimiento mediante un incremento de ribosomas en su actividad y síntesis. Altos niveles de traducción podrían incrementar las concentraciones de un indicador de crecimiento inestable, que podría ser la sugerida Cln3. Cuando Cln3 obtiene niveles suficientes se promovería la activación de *START*. Otros modelos implican la actividad dependiente de chaperonas asociada a la *ratio* de crecimiento, como factor liberador de Cln3. Este límite de crecimiento podría estar ajustado por nutrientes u otros factores, resultando en diferentes tamaños celulares, posiblemente dependiente de la síntesis de los ribosomas. Este incremento de ribosomas inhibiría la activación de SBF y MBF por vías aún desconocidas. Otra incógnita es como una elevada ploidía celular también reduce la activación de SBF y MBF, por un mecanismo que aún es desconocido. Adaptado de [24].

Otros mecanismos podrían estar también implicados en la determinación del tamaño celular. Uno de ellos podría consistir en el número de promotores MBF/SBF

presentes en el genoma, lo que implicaría una necesidad más alta de Cln3 a mayores dosis génicas, relacionando así el tamaño celular con la ploidía [198].

Estos mecanismos que implican la maquinaria de ejecución de *START* podrían confluir para determinar el tamaño celular de forma robusta y precisa, por lo que cualquier modificación sobre Whi5 o Cln3, en su transcripción [199], traducción [200] o estabilización [35] podrían implicar variación en el tamaño celular. Además, debe tenerse en cuenta que la transición a través de *START* también depende del complejo Ccr4-Not y *BCK2* [201], [202].

Otro parámetro clave en la regulación del tamaño celular es la traducción de proteínas [19], [203], [204] ya que se observa una relación clara entre el tamaño celular y las tasas de biogénesis de ribosomas y de traducción de proteínas [205], [206]. La iniciación de la traducción debe tener una relevancia particular, ya que su inhibición mediada por la vías de señalización TOR y PKA en respuesta a depleción de nutrientes permitiría explicar el menor tamaño de las células sometidas a limitación nutricional [207], [208].

Muchos de los reguladores más importantes han sido descubiertos por estudios sistemáticos de mutantes que provocan cambios en la distribución del tamaño en las poblaciones celulares [209]–[212]. En estos estudios tienen limitaciones, y es difícil diferenciar los mutantes que afectan directamente al sistema de regulación del tamaño celular o que tienen un efecto indirecto modificando la morfología propia de la célula [190]. Por este motivo es tan importante la microscopía *time-lapse* para el estudio del sistema de control del tamaño celular [190], [213].

Tamaño celular y la ploidía

Boveri, Hertwig y sus colegas [214] observaron una clara relación entre el número de cromosomas, el tamaño del núcleo y el de la célula. Fenómeno que aún continúa siendo foco de discusiones y estudios. En los años 50, tras el estudio de múltiples sistemas celulares se establece una relación de proporcionalidad casi directa entre la ploidía, el número de juegos completos de cromosomas, y el tamaño de la célula, considerándose una propiedad casi universal [178]. En el caso de la levadura ha podido comprobarse una relación directa concluyendo que la ploidía determina el tamaño de la célula en división [46], [215]. Pero la relación entre estas dos

características a lo largo de toda la escala evolutiva continúa siendo una incógnita [216].

Una de las hipótesis más sencillas que intentan explicar este fenómeno se limita a considerar el número de copias de genes, que conllevaría como efecto final al incremento del tamaño celular. Sin embargo, existen evidencias de que este incremento de tamaño dependiente de la ploidía debe tener un sistema activo de regulación (Figura 14).

En *S. cerevisiae*, este fenómeno se acentúa donde existe una clara relación lineal entre el tamaño de la célula y su contenido de DNA, sugiriendo dos posibles modelos que permitirían que la ploidía regulara el tamaño celular: la producción de un factor específico acorde con la ploidía, o un factor inversamente dependiente de la ploidía [217].

El primer modelo podría basarse en un inhibidor específico de una etapa del ciclo, cuya transcripción respondiera al número de copias de DNA. Si dicha transcripción crítica es estable, la cantidad fija producida del inhibidor se diluiría a medida que la célula creciera hasta llegar a un umbral determinado y fijar así un tamaño crítico en función de la ploidía [218]. Esta hipótesis parece coger peso actualmente gracias a las observaciones y estudio de *Whi5*, que se transcribe en el anterior período G_2/M de forma dependiente de la dosis génica, pero independiente de tamaño, y se diluye durante el siguiente G_1 hasta alcanzar un nivel mínimo determinado en *START* [192]. Sin embargo, la eliminación de una de las copias de *Whi5* en una célula diploide no produce un tamaño celular igual a una célula haploide, lo que sugiere la existencia de otros factores aún desconocidos.

El segundo modelo estaría basado en un factor regulado por titulación genómica [218]–[220]. En este caso podría tratarse de una proteína activadora sintetizada de forma constante que se uniese a diferentes secuencias del genoma. De este modo, el incremento de ploidía incrementaría el número de secuencias de unión y precisaría un mayor nivel del activador que, al ser su síntesis constante, implicaría un mayor tamaño celular. Este modelo se ha sugerido para *Cln3* en su unión a los complejos SBF [198].

La célula es capaz de modificar su ploidía de forma activa para una mayor capacidad de adaptación a entornos negativos y a diferentes tipos de estrés [221]. Este fenómeno puede aportar beneficios metabólicos y la protección de mutaciones

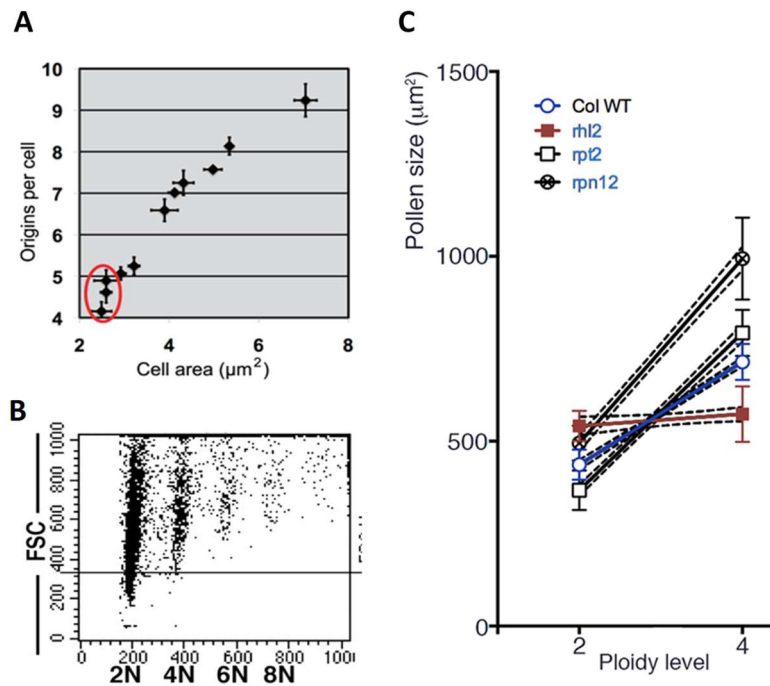


Figura 14: Evidencias de un tamaño celular regulado por ploidía

A lo largo de todo el árbol de la vida se encuentran ejemplos de cómo las células incrementan su tamaño celular dependiente de la ploidía. En *E. coli* se observa una clara dependencia del área celular con el número de orígenes de replicación (A) [304], en células de mamífero, en hepatocitos, se observa distribuciones poblacionales que incrementan de tamaño a la vez que lo hacen según su número de ploidía (B) [305] y en plantas también se observa en el tamaño del polen un incremento dependiente del nivel de ploidía (C) [306].

deletéreas [222]–[224]; pero todo ello bajo el coste de un incremento de defectos en la estabilidad genómica [225], [226].

7. Vectores y el tamaño celular

La utilización de vectores en levadura permite de forma artificial, mimetizar y valorar los efectos que producen diferentes genes, ya sea en su forma salvaje o siendo modificados, en *S. cerevisiae*. Su utilización casi universal en todos los campos de estudios de levadura ha permitido darle funcionalidades muy diversas en su aplicación en ciencia básica, biotecnología y biología sintética [227]–[229]. Los primeros vectores construidos son los llamados vectores lanzadera (Figura 15) [230], formado por DNA híbrido de *E. coli* y *S. cerevisiae* [231], [232]. Estos sistemas de vectores circulares de DNA, también llamados plásmidos, han sido modificados y mejorados generando un gran número de versiones y series, como son los conocidos pRS [233], [234], pRG [235] y otros vectores lanzadera especializados [228].

Tipos de vectores lanzadera

Estos vectores tienen en común la presencia de genes auxotróficos y resistencias a antifúngicos, para su selección y mantenimiento en levadura [236]–[238]. Se encuentran 3 posibles modalidades: los plásmidos centroméricos o YCp, los plásmidos episomales o YEp y los plásmidos integrativos o YIp.

Los plásmidos YCp (Figura 15A) se identifican por utilizar el sistema endógeno de la célula de replicación y segregación cromosómica, persistiendo como minicromosomas muy estables y en bajo número, 1-5 copias/célula [239]. Los YCp contienen una secuencia de replicación autónoma o ARS (de las siglas en inglés, *Autonomously Replicating Sequences*) [240]–[242] y secuencias centroméricas o *CEN*, que permiten su unión a puntos del cinetocoro y aportan una segregación similar a los cromosomas [243]. Ahora bien, el mantenimiento de múltiples plásmidos con estas características aporta inestabilidad genómica [244], [245]. En la actualidad se han diseñado versiones más complejas y con mucha más capacidad, los llamados cromosomas artificiales de levadura o YAC [246], que imitan las características que tienen los cromosomas y permiten su mantenimiento en forma lineal gracias a la presencia de secuencias teloméricas.

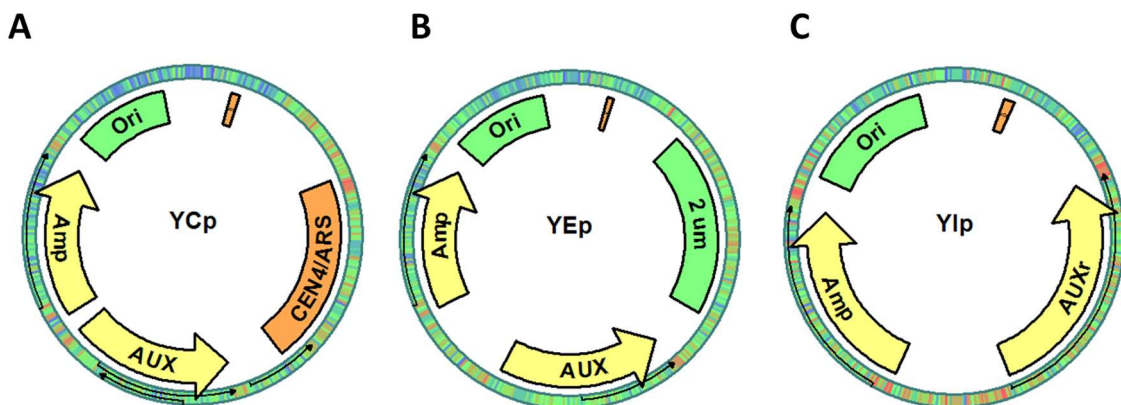


Figura 15: Vectores lanzadera

Visión simplificada de los tres principales tipos de vectores lanzadera en levadura, todos ellos comparten un origen de replicación (Ori) y resistencia a ampicilina (Amp) que permiten su amplificación en *E. coli* y un lugar de clonación con múltiples puntos de restricción (MCS). De cada uno se encuentran diferentes versiones que dependen del gen auxotrófico de selección para levadura (AUX). La principal entre ellos radica la presencia de una secuencia CEN y ARS en YCp (A), un sistema de replicación 2µm en YEp (B) y un gen AUX que permite ser cortado mediante enzimas de restricción generando colas recombinantes (AUXr) para su integración genómica en el caso de los YIp (C).

INTRODUCCIÓN

Los plásmidos YEp (Figura 15B) están presentes en muchas de las cepas salvajes y de laboratorio de *S. cerevisiae*, basadas en secuencias propias de plásmidos naturales de levadura [247]. Estos, a diferencia de los anteriores, se presentan en un número alto de copias por célula, 40-80 [248], [249], gracias al sistema de replicación 2μ (o 2μ), que contiene un origen de replicación propio y regulado por proteínas codificadas en el mismo plásmido [240], [250]–[252]. Aunque actualmente se desconoce el modo de segregación en mitosis [253], se sabe que es un proceso poco fiel y produce células con números de plásmidos muy distintos [254], [255].

Los plásmidos YIp (Figura 15C) están destinados a su integración genómica en el huésped final. Este finalmente se transmite a la progenie gracias a ser parte de un cromosoma. Su característica principal se basa en tener secuencias homologas al lugar de integración en el genoma. Secuencias homólogas de unos pocos centenares

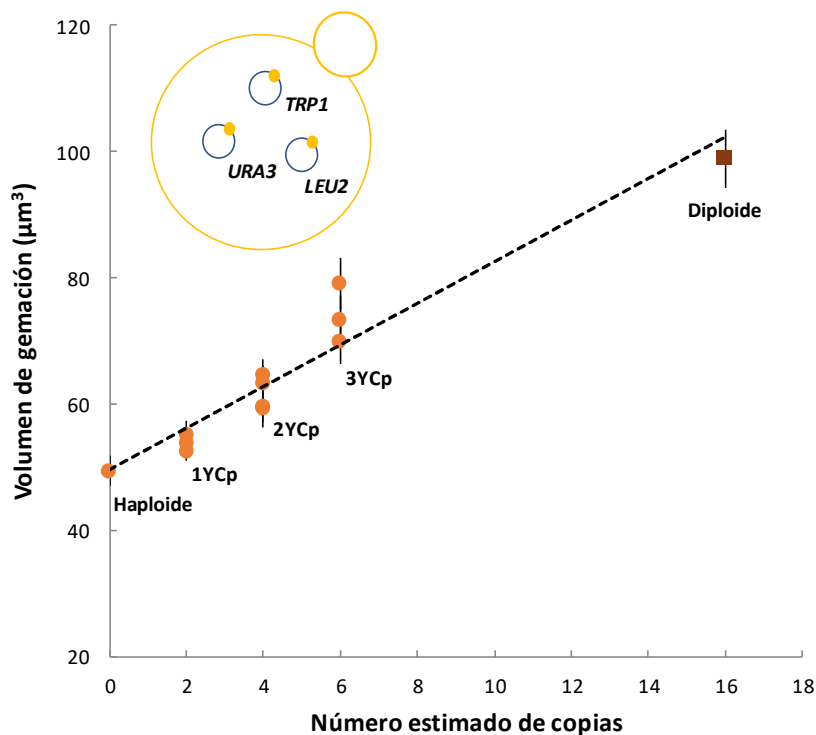


Figura 16: Los YCp incrementan el volumen celular coherente con la ploidía

Células haploides a las que son incorporados 1, 2 o 3YCp independientes incrementan el volumen celular, determinado mediante microscopía en cultivos asincrónicos. El volumen es proporcional en el número estimado de copias, y la tendencia concuerda con el volumen final de células diploides, se indica la línea de tendencia (ralla discontinua). Se introduce un pequeño esquema donde se indican las auxotrofías aportadas por los plásmidos YCp independientes (3YCp).

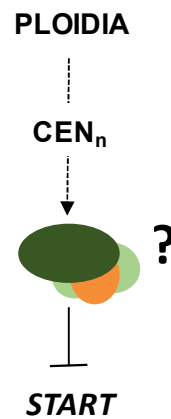


Figura 17: Modelo de regulación del tamaño celular por ploidía

Esquema simplificado del hipotético sistema de regulación del tamaño celular dependiente de la dosis centromérica aportada por la ploidía. Se propone que determinadas proteínas del sistema de señalización centromérica podrían ejercer un papel inhibitorio de *START*.

de bases son suficientes para asegurar una integración correcta y eficiente [256] mediante la utilización de la maquinaria de recombinación homóloga propia de la célula [257].

Alteración del tamaño celular por vectores: observaciones preliminares

Como he descrito anteriormente, los vectores son utilizados por sus múltiples aplicaciones y estudios. Este elemento es algo que se aporta artificialmente, compuesto no únicamente con nuestro inserto de interés, sino también por otros componentes que pueden influir directa o indirectamente en el estudio. Por este motivo, en experimentos en que se ensayan variantes de un gen concreto en un vector lanzadera es necesario incluir como control negativo la estirpe portadora del vector vacío para contrastar los resultados obtenidos.

Durante un estudio del grupo iniciado anteriormente a esta tesis sobre los efectos de distintos sistemas de chaperonas en el tamaño crítico de *S. cerevisiae* (Moreno et al., enviado a publicación), se observó un fenómeno antes no descrito: la presencia de un, dos o tres YCps producía un incremento lineal del tamaño celular compatible con el incremento de tamaño crítico de gemación de la célula diploide (Figura 16). Estos resultados sugerían que algún elemento plasmídico no descrito que podría estar implicado en la regulación del tamaño celular, quizás de modo similar al control por ploidía.

INTRODUCCIÓN

El estudio de este fenómeno y cómo afecta a los principales sistemas de regulación de tamaño podrían aportar nuevos conceptos a esta regulación largamente desconocida.

Precisamente, esta tesis explora este fenómeno, partiendo de la hipótesis que el número de secuencias centroméricas podrían jugar un papel importante en la regulación del tamaño celular (Figura 17).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis inicial:

La regulación del tamaño celular por ploidía se lleva a cabo mediante mecanismos de señalización centromérica

Principales objetivos:

- Determinar el elemento responsable del incremento celular observado por los YCp y descartar otras posibilidades.
- Diseñar un sistema de cuantificación para relacionar la dosis centromérica respecto el tamaño celular observado.
- Mimetizar la respuesta al número de centrómeros aportados artificialmente mediante otros sistemas.
- Analizar la respuesta al incremento de centrómeros en el ciclo celular durante la fase G₁ y los componentes de *START*.
- Analizar el papel de los componentes señalizadores del centrómero como reguladores de *START*.
- Analizar la interacción funcional y física de los diferentes componentes del modelo de trabajo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Medios y condiciones de cultivo

Medios

Para el crecimiento de levaduras se utilizaron medios YP (1% Extracto de levadura, 2% peptona) o SC (0.17% YNB-AA-AS, 0.67% *drop-out*, 0.5% $(NH_4)_2SO_4$) suplementados con diferentes azúcares al 2%: glucosa, galactosa o rafinosa. Para la selección de cepas con plásmidos mediante su auxotrofia se utilizó SC carente del aa o nucleótido específico (*drop-out*). En el caso de ser necesario un aporte externo, se introdujo triptófano (40µg/mL), leucina (120µg/mL), histidina (20µg/mL) y uracilo (20µg/ml). Para la selección de cepas con marcajes (*tags*) o deleciones de genes mediante selección con antibióticos se utilizaron placas YP con 200µg/mL geneticina (*DUCHEFA*), 300µg/mL higromicina B (*Sigma*) o 200µg/mL nourseotricina (*Werner BioAgents*). En el caso específico de W303 y para la obtención de diploides el medio YP se añadió un aporte adicional de adenina a 40µg/mL.

El medio que se utilizó para el crecimiento de bacterias fue LB (1% peptona, 1% NaCl, 0.5% extracto de levadura). Para la selección de plásmidos se añadió ampicilina (Amp) (*ROCHE*) a 50µg/mL. En el caso de formato sólido para placas de cultivo se añadió agar al 2%.

Condiciones de cultivo

Tras la selección en medios de cultivos específicos en placa, los cultivos celulares de levadura en líquido se iniciaron desde un pre-inoculo de 5-6 colonias. Este se diluyó a 0,005OD₆₀₀ en medios con glucosa, y 0,01OD₆₀₀ para los medios con galactosa. El crecimiento de los cultivos se realizó durante 16h a 30°C, exceptuando cepas termosensibles que se hizo a 25°C, hasta que se obtuvieron cultivos de crecimiento en exponencial y asincrónico con un mínimo de 7-8 generaciones. Se utilizaron medios de galactosa para el mantenimiento de las formas inactivas de *GALp-CEN3* presentes en los vectores utilizados y las modificaciones cromosómicas. La superexpresión de proteínas desde vectores YCpGAL se indujo mediante la exposición a 200nM β-Estradiol de *Sigma-Aldrich*. Se utilizaron incubadoras de agitación tipo *Multitron* o *Multitron Standard* de *Infors HT* o *MaxQ4000* de *Barnstead* a 180-200rpm.

2. Construcción de cepas de levadura

Cepas de origen o previamente construidas

En nuestro estudio se incluyeron cepas salvajes o modificaciones de las mismas ya pertenecientes al laboratorio. Se utilizó la cepa salvaje CML128 [258] y sus derivadas CML128 mCherry, que incluye una copia de *TEFp-mCherry* integrada genómicamente. CML128-Pgen361 que contiene el inserto *ADHp-GAL4DBD-hER-VP16* que permite la inducción del promotor *GAL* mediante estradiol [259] y CML128 *whi5*, al que se le ha eliminado el gen *WHI5* mediante la disrupción con un casete *KANMX4*. También se utilizó la cepa salvaje W303-1A y sus derivadas termosensibles W303-1A *cdc4-1*, W303-1A *cdc43-1* y W303-1A *cdc53-1*. La cepa KSY083-5, derivada de W303-1A, contiene la fusión *mCitrine-CLN3-11A* [192]. La cepa IMX678, derivada de CEN.PK, contiene la copia genómica de expresión de la endonucleasa *CAS9* y se utilizó en la modificación mediante *CRISPR/CAS9* [260]. Para el estudio con diploides se utilizó la cepa salvaje 1788 [261], el ancestro de CML128, para contrastar los resultados respecto a las mutaciones generadas. Y finalmente para el estudio de interacciones *in vivo* se utilizó la cepa YJD43-1 *grr1::NLS-mRFP-LEU2 CLN3-13myc-HIS3 cdc4-1::HYG* [82].

Obtención de casetes de modificación genética

La modificación de genes, ya sea para su marcaje o eliminación, de levadura se realizó según el sistema descrito por [262] por recombinación de fragmentos de DNA y selección con marcadores auxotróficos o antibióticos, a excepción de la construcción de cepas con cromosomas dicéntricos condicionales en la que se utilizó la técnica *CRISPR/CAS9* (ver apartado específico). La lista completa de las cepas construidas en este estudio se puede encontrar en el apartado tablas adicionales.

Todas las PCRs de amplificación de casetes y fragmentos de DNA, para modificaciones genéticas o determinación analítica de su correcta integración, se utilizaron termocicladores *MyCycler™* de *Bio-Rad*. Los casetes para modificaciones genéticas se obtuvieron utilizando la polimerasa *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (*Thermo Scientific*). La reacción se realizó en 50µl de reacción de PCR con 0.5µM oligo1, 0.5µM oligo2, 0.2mM of dNTPs, 1x *phusion HF buffer*, 0.5mM MgCl₂, 0.5µl DNA genómico, o 1µl de plásmido obtenido por *Mini prep* y 0.5µl *Phusion DNA Polymerase* (2 U/µL). El protocolo que se utilizó fue 98°C 3min (DNA genómico)

o 30seg (plásmidos), [98°C 20seg, T_m 30seg, 72°C 1min/1000bp] 30 ciclos, 72°C 10min. La T_m se adaptó el par de oligonucleótidos utilizados.

Los amplicones se limpiaron de la solución de PCR con el *kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* de *Macherey-Nagel* por elución final en 40µL de H₂O Milli-Q (Millipore) (MQ), y se utilizaron 5µL, añadiendo 1µL 6x *Orange DNA Loading Die* de *Thermo Scientific*, para comprobar su tamaño y concentración mediante electroforesis en geles de agarosa 0.8% en *buffer* TAE.

Modificación mediante el sistema *CRISPR/CAS9*

A excepción del resto de cepas modificadas, la IMX678 *GALp-CEN4::ChIV; GALp-CEN4::ChVII* se obtuvo mediante la técnica *CRISPR/CAS9* [260]. El protocolo original se modificó para mejorar la eficiencia en la obtención de los plásmidos correctos, ya que utilizándose la recombinación *in vivo* propia de levadura pueden aparecer formas con secuencias *CRISPR* diferentes: las dos originales (correspondientes a *CAS1* y *ADE2*), una combinación entre una original y una específica para la modificación deseada, pudiendo ser dos diferentes, y finalmente la que tiene ambas para las dos modificaciones deseadas.

Primero se prepararon dos DNA modelo independientes procedentes del plásmido pROS17 con marcador auxotrófico diferente al plásmido final a utilizar (Figura 18A). Estos se diferenciaron por las dos *CRISPR* separadas, es decir un fragmento con *SNR52p-CAS1* y otro con *SNR52p-ADE2*. Estos dos modelos tienen la característica de que no contienen regiones de homología, ni entre ellos ni con el plásmido final. Con cada uno de ellos se amplificó utilizando oligonucleótidos que se diseñaron con la secuencia *CRISPR* de interés y con las secuencias homólogas de 15pb necesarias para la recombinación: para el fragmento central 2µm y extremos con el plásmido. Finalmente, estos dos nuevos fragmentos se transformaron conjuntamente con el amplicón del plásmido pROS10, con extremos homólogos a los que presentan los dos nuevos DNAs en una cepa CML128. Se amplificó el plásmido en bacterias y se envió a secuenciar para confirmar las secuencias *CRISPR* correctas.

Segundo, se modificó la cepa salvaje como se observa en la Figura 18B. Se transformó el nuevo pROS10 conjuntamente a los DNA de reparación, que consisten en unos fragmentos que contienen nuestro inserto de interés, *GALp-CEN4*,

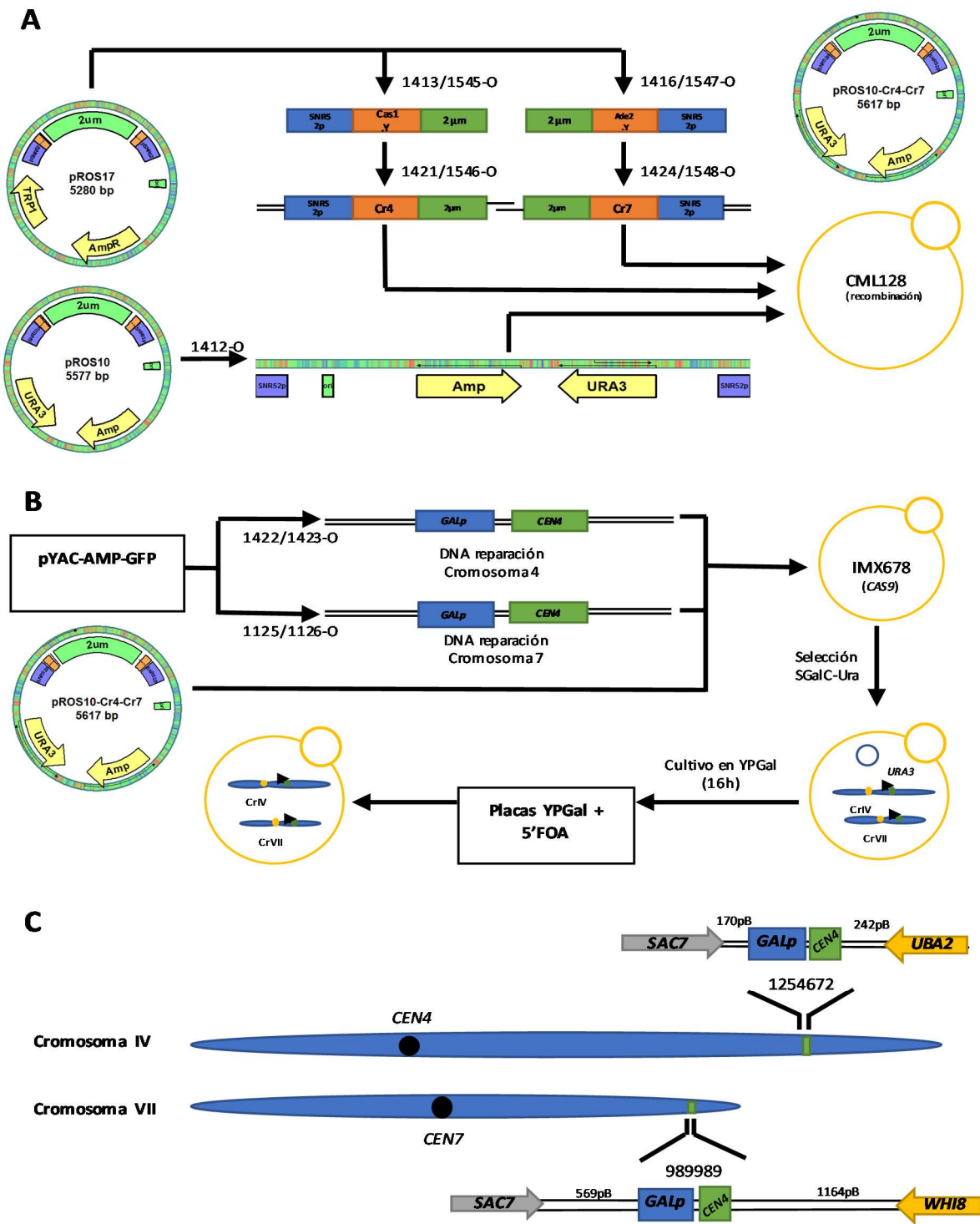


Figura 18: Protocolo modificado de CRISPR/CAS9

Resumen esquemático de los pasos realizados, (A) para la obtención del plásmido con secuencias específicas CRISPR para la rotura del cromosoma 4 y 7, se indican los oligonucleótidos utilizados para la amplificación mediante PCR, (B) los pasos realizados para la modificación la cepa con cromosomas dicéntricos condicionales, se incluyen el nombre de los oligonucleótidos utilizados para la obtención de los DNA de reparación, (C) localización de los nuevos centrómeros condicionales en los cromosomas 4 y 7, se indica coordenada de corte e información de la zona modificada.

flanqueados por 40pb de homología del DNA donde se dará la rotura por la endonucleasa Cas9 que contiene la cepa IMX678 integrada genómicamente. En este estudio se utilizaron dos DNA de reparación, uno para la reparación del cromosoma 4 y otro del cromosoma 7. Las transformantes se seleccionaron en SGalC-URA para mantener estos nuevos centrómeros condicionales inactivos, se realizó un cultivo de larga duración en YPGal para propiciar la pérdida del vector pROS10 y seguidamente se sembró en placas YPGal-5'FOA (1g/L) para la selección de células sin la presencia del gen *URA3*.

Se obtuvo una nueva cepa, IMX678 *GALp-CEN4::ChIV; GALp-CEN4::ChVII*, tiene dos nuevos centrómeros condicionales, en las coordenadas de los cromosomas 4 y 7 indicadas en la Figura 18C. Para la construcción de esta cepa se utilizaron las secuencias *CRISPR* aportadas por [263]. Se insertó el fragmento *GALp-CEN4* (DNA de reparación) en un lugar intergénico, flanqueado por dos codones STOP, mínimo de 500pb hasta nuestro lugar de corte con Cas9, si es posible. Se hizo así para evitar modificar el funcionamiento del promotor de los genes que se encuentran en los extremos. Además, se buscó un lugar con las características anteriores en un lugar central del brazo del cromosoma más grande, para evitar posibles problemas con el centrómero nativo del cromosoma. Para la integración del inserto *GALp-CEN4* en el cromosoma 4, se utilizó la secuencia ATCATGAAGAGGACAAATTA como *CRISPR* para el corte en la coordenada 1254672pb de este cromosoma, quedando a una distancia de 170pb del codón STOP de *SAC7* y a 242pb del codón STOP del gen *UBA2*. En el caso del cromosoma 7 se utilizó la secuencia TTCCACTGGCTGGAAGCTTG como *CRISPR*, en la coordenada 989989pb, quedando flanqueado por el codón STOP de *MGA1* a 569pb y *WHI8* a 1164pb.

Todos los oligonucleótidos que se utilizaron se pueden encontrar en las tablas adicionales para su consulta.

Transformación de levaduras

Se utilizaron levaduras creciendo exponencialmente a una densidad óptica entre 0.5 – 1 OD₆₀₀. Generalmente se utilizó medio YPD, excepto en casos de necesidad de otro tipo de azúcar o selección, dependiendo de las necesidades de la célula. Se recuperaron mediante centrifugación y se utilizaron 10 OD₆₀₀, para cada transformación con plásmido o casete de modificación genética, a 5000rpm 2min a TA. Estas se limpiaron de los restos de medio de cultivo resuspendiendo en 10mL H₂O

MQ por cada 10OD₆₀₀, y se centrifugaron en las mismas condiciones. El *pellet* celular se resuspendió en 1mL de solución 1 (10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA pH 8.0 y 100mM Li-acetato) por cada 10OD₆₀₀. Se traspasó a tubos individuales de 1.5mL y se centrifugó en una *MiniSpin* de *Eppendorf* a 5000rpm 2min a TA. El *pellet* resultante se resuspendió con la mezcla de transformación: 40µl de DNA de interés (1µg por cada plásmido o 2-4µg de casete de interrupción o marcaje, disueltos en *buffer* Tris-EDTA o TE, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5. 1 mM EDTA), 5µl de ssDNA (DNA de esperma de salmón, 2mg/mL) y 5µl de 1M Li-acetato. Seguidamente se le añadió 300µl de la solución 2 (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA pH 8.0, 100mM Li-acetato y 40% PEG-4000). Se mezcló e incubó durante 30min a 30°C, en una incubadora con agitación *MaxQ4000* de *Barnstead*. Seguidamente se procedió a realizar un choque térmico de 15min a 42°C en un baño seco de *Elite Major Science*. Las células se centrifugaron a 3000rpm 2min, se eliminó la mezcla de transformación y se resuspendió el *pellet* en 100µl de H₂O MQ. Finalmente, éste se sembró en placas selectivas para el marcador de interés. Si la selección se realizó mediante antibiótico, antes de proceder al sembrado se cultivaron las células en 2-5mL YPD dejándolas 6h a 30°C a 200rpm para expresar la resistencia. Se incubaron las placas a 30°C, exceptuando cepas termosensibles que se realizó a 25°C, durante 2-4 días dependiendo de la modificación realizada. En el caso de modificaciones con casetes, las colonias resultantes se reinocularon en forma de *patch* en una nueva placa con las mismas condiciones de selección y se incubaron durante 16h a 30°C.

PCR de colonia

Para confirmar la correcta integración de casetes de modificación genética se utilizó PCR de colonia. Las colonias provenientes de placas de selección se depositaron en un tubo de 200µl para PCR. Estas se irradiaron con microondas durante 2min. Seguidamente se introdujo en el tubo 20µl de mezcla de PCR. Para este tipo de reacción se utilizó la polimerasa *DreamTaq DNA polimerase* de *ThermoFisher Scientific*. La mezcla se obtuvo mezclando 0.5µM oligo1, 0.5µM oligo2, 0.2mM of dNTPs, 1x *Buffer DreamTaq Green*, 2U/µL *DreamTaq DNA Polymerase*. El programa que se utilizó fue: 95°C 3min, [95°C 30seg, T_m 30seg, 1min/1000bp 72°C] 35 ciclos, 72°C 5min. La presencia de estos amplicones analíticos se determinó mediante su visualización en geles de agarosa 0.8% o 2%, dependiendo el tamaño, en *buffer* TAE.

Extracción rápida de DNA genómico de levadura

Se hizo crecer la cepa de levadura seleccionada en 5mL de YPD hasta la saturación (aprox. 6-10OD₆₀₀/mL), exceptuando cepas con la necesidad específica de otros requerimientos. Se recuperó el *pellet* mediante la centrifugación a 5000rpm 2min. Se resuspendió el *pellet* en 0.5mL de H₂O MQ. Se centrifugó a 5000rpm 2min. Se eliminó el sobrenadante y resuspendió las células en 0.2mL *Buffer* A (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA pH 8). Seguidamente se añadió 0.2mL de *Glass Beads* y 0.2mL de solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se rompieron las células mediante *FastPrep*®-24 de *MP*TM, 30seg a 5m/s tres ciclos. Se añadió 0.2mL de *buffer* TE y centrifugó 5min a 13rpm. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo. Se añadió 1mL de etanol 100%, se mezcló por inversión y se centrifugó 2min a 13rpm a TA. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 0.4mL de TE. Se añadió 13.3µL 3M NaOAc (o 10µL 4M acetato de amonio), se mezcló y se añadió 1mL de etanol 100%. Se centrifugó a 2min a 13rpm. El sobrenadante se descartó y el *pellet* se limpió con 1mL de etanol 70%. Se volvió a centrifugar 2min a 13rpm y se eliminó el sobrenadante lo mejor posible. Se dejó secar con el tubo abierto entre 20-30min a TA eliminar las trazas restantes de Etanol. Finalmente, se resuspendió el *pellet* en 50µL de *buffer* TE o H₂O MQ.

Obtención de células diploides

Las células haploides se modificaron para obtener el genotipo de interés: las células MAT_a se modificaron con el marcador *KANMX4* y la MAT_α con el marcador *NATNT2*. Estas se cultivaron en *patch* en placas YPD durante 16h 30°C. Seguidamente las cepas de interés se cruzaron realizando un pequeño *patch* en placas YPD. Se incubaron durante 6h a 30°C. Se confirmó la formación de zigotos analizando el contenido del *patch* en el microscopio (*Zeiss PrimoStart*). A partir de este se realizó una estría en placas YPD-G418-NAT, y se incubó durante 16h a 30 grados a la espera de aparición de colonias.

3. Construcción de plásmidos y clonaje de genes

Todos los vectores y plásmidos que se utilizaron durante el trabajo se pueden encontrar en tablas adicionales.

Clonación de genes y vectores receptores

Las obtenciones de genes de interés que se utilizaron en esta tesis se amplificaron desde DNA genómico purificado de la cepa de levadura CML128 o desde otros vectores ya construidos, mediante PCR de alta fidelidad. La reacción se realizó en 50µl de reacción de PCR con 0.5µM oligo1, 0.5µM oligo2, 0.2mM of dNTPs, 1x *buffer Phusion HF*, 0.5mM MgCl₂, 0.5µl DNA genómico (o 2ng de vector receptor), 2U/µL *Phusion DNA Polymerase*. Se utilizó el siguiente programa: 98°C 3min (DNA genómico), [98°C 20seg, T_m 30seg, 72°C 1min/1000bp] 30 ciclos, 72°C 10min. La T_m varía según el par de oligonucleótidos utilizados. Finalmente, tanto los insertos como los vectores que se utilizaron en este estudio se limpiaron de la solución de PCR o restricción con el *kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* de *Macherey-Nagel*.

Construcción por recombinación homologa

El protocolo que se usó está basado en [264]. Los genes de interés se amplificaron con 15pb de homología, en los extremos, al lugar de integración en nuestro vector receptor. Los vectores se prepararon por digestión mediante enzimas de restricción o por amplificación para dotar de los mismos extremos homólogos. Se transformaron 200ng del inserto de interés y 100ng de vector la cepa de levadura CML128. Tras una selección mediante el marcador auxotrófico procedente del vector se hizo crecer las colonias resultantes de la transformación en 2mL medio selectivo, de 1 a 3 colonias independientes. El plásmido se extrajo mediante el *kit Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II* de *Zymo Research* en un volumen final de 10µL y finalmente se transformó en células competentes de *E. coli* DH5α.

Transformación en células competentes de *E. coli* DH5α

Se utilizaron 50µL de *Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells* de *Invitrogen* para la clonación de 5-10µL de DNA. La mezcla se incubó en hielo durante 30min. Se procedió a realizar un choque térmico de 1min 45seg. Se añadió 1mL de medio LB y se incubaron las células a 37°C durante 1h, para la expresión del gen de resistencia aportado por el vector introducido. Se centrifugó a 14000rpm 1min, y se eliminó el sobrenadante por decantación. Se resuspendió el *pellet* de células con el resto de medio. Finalmente, se plaqueó este contenido en placas de LB-Amp y se incubó un mínimo de 16h a 37°C.

Extracción rápida de plásmidos (*Jet Preps*)

Las colonias procedentes de la transformación con nuestro vector de interés, seleccionadas en placas de LB-Amp, se inocularon en 500µL de LB-Amp y se incubaron a 16h a 30°C. Se centrifugaron los cultivos a 14000rpm 1min y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 50µL de *buffer* BT (2% Triton X-100 pH12.4, ajustado con NaOH) sobre el *pellet* celular sin resuspender. Seguidamente se añadieron 50µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó vigorosamente durante 30min y se centrifugó durante 5min a 14000rpm. Se separaron 45µL del sobrenadante (porción soluble) en un tubo nuevo, reservando 5µL añadiendo 5µL de *6x Orange DNA Loading Die* de *Thermo Scientific* con 100µg/mL RNAsa para analizar el vector cerrado. Los 40µL restantes se utilizaron para precipitar el DNA añadiendo 4µL de ácido acético 2%, 4µL de NaOAc 3M pH8 y 100µL de etanol absoluto. Se centrifugó la mezcla a 14000rpm 5min a TA y se descartó el sobrenadante. Se limpió el *pellet* con 1mL nuevo de etanol 70%. Se centrifugó a 14000rpm 1min dos veces para eliminar al máximo los restos de etanol 70%, primero se eliminó el sobrenadante por decantación y en la segunda con micropipeta. Se dejó el *pellet* 20min a TA para evaporar posibles trazas de etanol y se resuspendió en 20µL de H₂O MQ. Esta solución de DNA se digirió mediante enzimas de restricción incluyendo 4µL de *6x Orange DNA Loading Die* de *Thermo Scientific* con 100µg/mL RNAsa. Se analizaron los vectores digeridos como no digeridos mediante electroforesis en geles de agarosa 0.8% en *buffer* TAE para confirmar la correcta construcción del vector.

Extracción de plásmidos para utilización experimental (*Mini Preps*)

Tras el análisis de una correcta construcción de nuestro vector de interés, se sembraron las colonias de DH5α positivas en una placa de LB-Amp en estría escocesa. Se incubaron durante 16h a 37°C. Se recuperaron 50µL de masa celular de la placa y se añadieron en 500mL de LB-Amp. La mezcla se centrifugó a 14000rpm 1min y se eliminó el sobrenadante. El *pellet* resultante se procesó utilizando el *kit NucleoSpin® Plasmid* de *Macherey-Nagel* obteniendo una concentración final de 200-600ng DNA/µL en 80µL H₂O. El vector se analizó mediante digestión por enzimas de restricción y electroforesis en geles de agarosa 0.8% en *buffer* TAE para confirmar la correcta construcción del vector.

4. Técnicas de proteína

Los anticuerpos para las técnicas descritas en este apartado se pueden encontrar en el apartado tablas adicionales.

Análisis de interacción a pequeña escala de proteínas con marcaje GST

Las células de levadura se pusieron en cultivo de aprox. 16h a 30°C en YPGal para la expresión de proteínas a partir de vectores pYES2 (en el caso de la cepa *cdc4-1 grr1 CLN3-13Myc* a 23°C durante 24h, seguidamente se transfirió a un medio YPGal a 37°C durante 2h) hasta obtener entre 1-2 OD₆₀₀. Se recolectó un *pellet* celular de 30OD₆₀₀ y se limpió con H₂O MQ a 4°C, dos veces, y seguidamente se centrifugó a 5000rpm 2min. El *pellet* final se congeló en nitrógeno líquido. Tras la descongelación el *pellet* se resuspendió en 100 µL *Buffer* de lisis con inhibidores de proteasas (25mM HEPES pH7.6, 400mM NaCl, 0.2% Triton-X100, 1mM EDTA, 10% glicerol, 0.04grajeas/mL *cOmplete™ Sigma-Aldrich* y 100µL 200mM PMSF. Esta mezcla se transfirió a un nuevo tubo incluyendo 250µL de *Glass Beads* y se rompió las células con *FastPrep®-24* de *MP™*, 30seg a 5m/s. Se añadieron 500µL *Buffer* de lisis con inhibidores de proteasas, se mezcló y se centrifugó a 5000rpm 5min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se guardó 20µL de este añadiendo 20µL de SSR2x (10% sucrosa, 0.01% Azul de Bromofenol con 1%DMF, 8%SDS, 0.25M Tris-HCl pH6.8, 0'1% 2-Mercaptoetanol) como muestra para el extracto celular (EC). Se prepararon 30µL de 50% *slurry Glutathione-Sepharoes beads*, para cada cepa a procesar, limpiándola 3 veces con 500µL con *Buffer* de lisis con inhibidores de proteasas. Se incubó el sobrenadante obtenido con las *beads* durante 2h a 4°C en rotación. Se lavó 7 veces con 1mL de *Buffer* de lisis (sin inhibidores de proteasas), invirtiendo el tubo 5 veces para mezclar y se centrifugó a 1000rpm 10seg para precipitar las *beads*. Finalmente, se eluyeron las proteínas introduciendo 50µL de 2xSSR sobre el *pellet* de *beads* y se incubó a 95°C durante 3 min. Se centrifugó a 1000rpm 10seg y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo.

Western Blot de transferencia Semiseca

Los geles de acrilamida utilizados se prepararon a diferentes porcentajes determinado por el peso molecular de la proteína a analizar en condiciones desnaturalizantes. Se preparó la porción *running* con Acrilamida/Bis-acrilamida al 30% con 0.375M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.08% Persulfato de Amonio y 0.1% TEMED. Para la fase *staining* (5% sobre la anterior) se preparó mediante Acrilamida/Bis-acrilamida al 30% con

0.125M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.066% Persulfato de Amonio y 0.1% TEMED. Las muestras de proteína se cargaron y se hicieron migrar a 20mA/gel durante 90 min. Se utilizó el sistema *Mini-PROTEAN® Tetra* y la fuente *PowerPac™ HC* de *BIO-RAD* incluidos los soportes, marcos y vidrios para estos sistemas.

Las membranas de transferencia PVDF de *Millipore* se activaron por rehidratación en metanol 100%, H₂O MQ y se equilibraron en *buffer* de transferencia (48mM Tris-base, 39mM glicina, 0,04% SDS, y 10% metanol).

El gel de acrilamida conjuntamente a la membrana se les incluyó papeles de transferencia de *GE Health care*, y se colocaron en un sistema de transferencia semiseco *Trans-Blot®* de *BIO-RAD*, y las proteínas se transfirieron a 60mA/gel durante 1h.

Las membranas se bloquearon con 5% leche PBS-T (8g de NaCl, 0.2g de KCl, 1.44g de Na₂HPO₄, 0.24g de KH₂PO₄ y 0.1% Tween-20) durante 1h a TA.

El anticuerpo primario se añadió durante 2h a TA u *overnight* a 4°C. La membrana se limpió utilizando PBS-T, 3 veces con duraciones de 15min, 10min y 5min. Seguidamente se incubó con el anticuerpo secundario en PBS-T al 0.025% leche desnatada durante 45min a TA. La membrana se lavaró con PBS-T, 3 veces con duraciones de 15min, 10min y 5min, y seguidamente se incubó con *Clarity™ Western ECL Substrate* de *BIO-RAD* durante 5min. La señal se detectó utilizando un procesador de imágenes (*Amersham Pharmacia Biotech de Amersham*).

5. Métodos de biología celular

Sincronización de células en G₁ mediante α -factor

El cultivo en exponencial de levaduras a OD₆₀₀ de 0.5 se incubó durante 2h a 30°C, seguidamente se añadió α -factor (*BIOMEDAL*) a una dilución final de 20µg/mL y se mantuvo durante 2h a 30°C. Se confirmó la aparición de la morfología *shmoo* mediante un microscopio óptico (*Zeiss PrimoStart*). Se centrifugó el cultivo a 2000rpm 2min, se resuspendió el *pellet* en 1mL de medio nuevo, y en ese momento se inició el cronómetro. Se transfirió a un tubo de 1.5mL donde se centrifugó de nuevo a 2000rpm 2min. Se repitió una vez más el lavado y centrifugado. Finalmente, el *pellet* se resuspendió en 1mL de medio nuevo, se añadió el volumen final de medio de cultivo deseado y se recogieron muestras a tiempos deseados.

Procesado de células mediante citometría de flujo (FACS)

Se analizó el contenido de DNA y su distribución en cultivos asincrónicos fijándose 100µL de cultivo a 0.8-1OD₆₀₀ en 1mL etanol 70% durante 1h. Se centrifugó a 5000rpm 2min, para eliminar el sobrenadante al máximo. Se dejó secar a TA durante 10 minutos. Se añadieron 500µL de citrato sódico 20mM suplementado con 10µg/mL de RNAsa y se incubó la mezcla a 37°C durante 4h o a 30°C 16h. Se añadieron 500µL de citrato sódico 20mM suplementado con 2µg/mL de yoduro de propidio. Se sonicaron las muestras a 100% amplitud durante 1seg y se procesaron las muestras mediante un citómetro de flujo *FACScalibur* (*Becton Dickinson*). Finalmente, los perfiles poblacionales se obtuvieron con el programa *WinMDI 2.9*.

Tinción de núcleos con DAPI para levaduras

Se fijaron 100µL de células en cultivo, en crecimiento exponencial entre 0.5-1OD₆₀₀, con 1.4mL de etanol 70%. Las muestras se incubaron 10 minutos a TA y se centrifugaron a 5000rpm 2min. Se resuspendió el *pellet* en 1mL de PBS, se sonicaron las muestras 1seg a 40% de amplitud y se centrifugaron a 5000rpm 2min. Se resuspendieron los *pellets* en una solución limpia de PBS con 1µg/mL DAPI y se incubaron a TA en oscuridad durante 20min. Se centrifugaron a 5000rpm 2min y se resuspendieron en 10 µL de PBS 1µg/mL DAPI. Finalmente se cogieron 5µL de células teñidas y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia *Nikon600* utilizando un cubo de filtro UV-2E/C para DAPI. Finalmente, se procedió al conteo de células con la presencia de 1 núcleo o 2 núcleos (n>200).

Enriquecimiento de células de primer ciclo (gradientes de Ficoll)

Los gradientes de Ficoll se prepararon a partir de una solución inicial 10% Ficoll (10% *Ficoll® PM 400* de *Sigma-Aldrich* en PBS) de la que se hicieron diluciones en PBS de 8% Ficoll, 6% Ficoll, 4% Ficoll y 2% Ficoll. Los tubos cónicos de 15mL se inclinaron para evitar una mezcla excesiva durante la adición de soluciones, y se introdujeron 2mL lentamente de cada solución preparada de más a menos concentrada. Finalmente, se guardaron en vertical 16h a 4°C para permitir la formación de un gradiente continuo por difusión.

A partir de cultivos en exponencial de las cepas de interés se recuperaron 30 OD₆₀₀, y se centrifugaron a 2500rpm 2min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* con 1mL de PBS estéril. Las células se lavaron previamente con 20mL H2O

MQ si el cultivo procedía de medio YPD o YPGal, y se colocaron sobre los gradientes de Ficoll inclinando también los tubos para evitar una mezcla excesiva. Con la ayuda de una micropipeta se rompió la interfase generada por las células y el gradiente, y se centrifugaron los tubos a 1250rpm 6min a TA. Se recuperaron 0.5-1mL de la fase superior de las células, se transfirió a nuevos tubos de 1.5mL que se centrifugaron a 2500rpm 2min. El sobrenadante se eliminó y se resuspendió el *pellet* en 50µL de medio de interés. Se confirmó un nivel menor del 30% de células en gemación mediante microscopia (*Zeiss PrimoStart*). Seguidamente, las células se procesaron según nuestro interés experimental, esperando 90min (glucosa) o 120min (galactosa) para obtener un porcentaje de gemación superior al 90%.

6. Técnicas de Microscopia *in vivo*

Preparado y fijado de las células

Se cogió entre 0.5-1mL de cultivo asincrónicos procedentes de medios SC con 0.3-0.8 OD₆₀₀ o YD 0.5-1.5 OD₆₀₀ (los que se limpiaron del medio de cultivo con PBS), se centrifugaron a 5000rpm 2min y se concentraron en una gota de 30µL de medio SC o PBS. La gota se depositó sobre un portaobjetos o cámara de cultivo (para microscopía *time-lapse*) donde se había aplicado una capa de concanavalina A de *Sigma-Aldrich* (0.3mg/mL). Tras 5min a TA se limpió la gota con 3 lavados de SC o PBS, se añadieron 10µL de estos medios para cubrir con un cubreobjetos o se cubrió de medio de cultivo en el caso de la cámara. En ningún caso se utilizó YP, ya que imposibilita un correcto fijado de las células a la concanavalina y produce autofluorescencia.

Obtención de imágenes

Las imágenes para el análisis del volumen celular, niveles de fluorescencia y seguimiento de células mediante *time-lapse* se obtuvieron mediante un microscopio de fluorescencia automatizado *AF7000 Live Imaging System* de *Leica* con cámara *Hamamatsu C9300-221 High Speed Camera*.

Para el seguimiento *time-lapse* de células y fluorescencia *in vivo* se utilizaron cámaras de cultivo redondas y soporte especial tipo *PeCon Microscope Incubator BL* con regulador de temperatura. El cultivo se mantuvo a 30°C para el óptimo crecimiento de las células. Los campos seleccionados se fotografiaron a intervalos de 5min

durante 3-4h, utilizándose el soporte automatizado XY y la posibilidad de autoenfoco del microscopio. Para la obtención de todas las imágenes se utilizó un objetivo 63x de inmersión.

Los datos del volumen celular se obtuvieron de imágenes *Brightfield* para luz transmitida (Figura 1) [18]. En el caso de las imágenes para la fluorescencia se utilizaron los cubos de filtros fluorescentes, filtros externos de excitación y emisión siguientes: para la señal GFP: eGFPselectivo, (482/8), (520/28); señal mCherry: GmC (572/35), (640/50); y la señal mCitrina: C-Y (500/20) (500/20).

Análisis de imágenes y obtención de resultados

Los datos de volumen celular en (μm^3) y niveles relativos de fluorescencia (unidades relativas, o u.r) que se obtuvieron en los diferentes experimentos mediante microscopia se analizaron a partir de imágenes utilizando el software *ImajeJ* y el *plugin BudJ* [18]. Con este *plugin* se determinaron los límites celulares para calcular el volumen celular y obtener datos de fluorescencia dentro de estos límites. Para el cálculo de la ratio GFP/mCherry, primero se eliminaron los respectivos ruidos de fondo de las fluorescencias, se dividieron los resultados, y éstos se ordenaron de menor a mayor nivel antes de representarlos respecto del volumen celular. A estas ratios se les aplicó un sistema de normalización interno, considerando como 1 la división de la media del valor experimental de GFP/mCherry por cada fuente de fluorescencia GFP (3 en el caso de 3YcP-TEFp-GFP o 1 YAC-TEFp-GFP) para la obtención del valor relativo de número de copias del vector del estudio.

Para el estudio de las velocidades de crecimiento, se aplicó el *plugin BudJ* a las imágenes obtenidas por *time-lapse* y se representó la variación del volumen celular desde un evento de gemación hasta el siguiente. La velocidad de crecimiento de la célula madre antes de la gemación se calculó mediante la pendiente de una regresión lineal.

En el estudio de la entrada nuclear de mCitrina-Cln3-11A, los niveles de fluorescencia para mCitrina en el citoplasma y núcleo se analizaron mediante el uso del *plugin BudJ*, pero en este caso se utilizó la función fluorescencia en *cluster* o región. El algoritmo identifica el centro de gravedad de los píxeles con mayor fluorescencia como centro nuclear, al cual se otorga el 7% del tamaño total de la célula [265]. Finalmente, esta señal se relativizó al nivel citoplasmático y se representó respecto el tiempo.

Estudio estadístico

Para el estudio estadístico de los resultados de esta tesis se utilizó el paquete estadístico asociado al software *Microsoft Excel* (2007), tanto para la obtención de medias, desviación estadística y límites de confianza como en la prueba *t-Student* para determinar diferencias significativas entre las medias de las muestras estudiadas.

RESULTADOS

Los YCp incrementan el volumen crítico durante G₁

El primer objetivo en este estudio se centró en caracterizar como los vectores YCp promueven un incremento en el volumen medio celular, es decir, qué elementos presentes en ellos inducen este fenotipo en las células y en qué fase del ciclo celular está ocurriendo. Por ese motivo se quiso descartar los efectos que podrían estar dando los marcadores nutricionales *TRP1*, *LEU2* y *URA3* aportados por los plásmidos YCp que se utilizaron para el estudio [266]. Se debió descartar este posible efecto ya que se han descrito varios casos en el que el tamaño celular se modifica según las condiciones nutricionales [208], [267], [268].

Por esta razón se modificó la cepa salvaje, CML128, introduciéndose los tres marcadores de selección llamándola 3aux. Esta cepa, por tanto, recuperó la capacidad de completar las vías de síntesis para la leucina, triptófano y uracilo. Tras

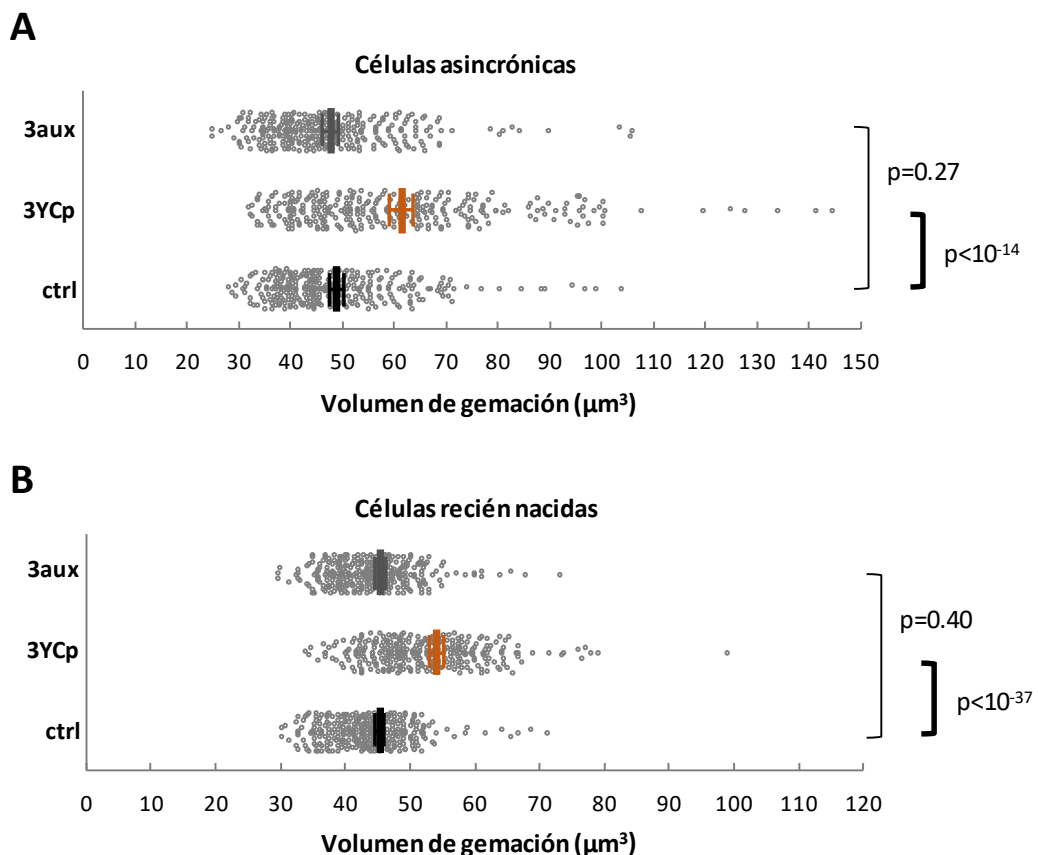


Figura 19: La presencia de 3YCP incrementan el volumen crítico de gemación independientemente del efecto aportado por sus marcadores nutricionales durante la fase G₁.

Volumen de células individuales durante la gemación en cultivos asincrónicos ($n>300$) (A) y cultivos enriquecidos en células recién nacidas mediante gradientes de Ficoll (B). En ausencia (ctrl) o presencia de 3YCp o 3aux. Se indica la media (línea vertical), límites de confianza ($\alpha=0.05$, líneas horizontales) y el p valor para las medias analizadas indicadas.

mantener en crecimiento asincrónico nuestra cepa control (ctrl), 3aux y la contenedora de los 3 vectores YCp (3YCp) se procedió a medir su volumen medio celular. En primer lugar, se analizaron todas las células madre que han gemado y por tanto que han superado el volumen crítico de *START*, Figura 19A, y se obtuvo la distribución poblacional del volumen de gemación entre las diferentes cepas. Analizando la media de cada una se observó como la presencia de los vectores promueven un incremento significativo del volumen celular, pasando de $48.53\mu\text{m}^3$ a $60.89\mu\text{m}^3$, un incremento del 25.5% respecto al inicial. En el caso de la cepa 3aux, su media se mantuvo en $47.43\mu\text{m}^3$.

Los principales sistemas de regulación del tamaño celular descritos en la levadura *S. cerevisiae*, implican a la maquinaria de *START*, por lo que determinan el mayor aporte del crecimiento celular depende de la fase G_1 [52], [209], [269]. Por esta razón fue interesante determinar si este incremento inducido por los vectores YCps se da durante G_1 . Para observar el efecto durante la primera fase G_1 celular se procedió a analizar cultivos de células recién nacidas obtenidas de gradientes de Ficoll, después de reanudar su crecimiento por 90 min para entrar en ciclo por primera vez. Como se observa en la Figura 19B, la variabilidad del volumen de gemación fue menor que en células de cultivos asincrónicos. Mientras que la cepa 3aux no vio afectada su volumen de gemación respecto a la cepa control, la cepa 3YCp mostró un claro incremento en el volumen de gemación, pasando de $43.41\mu\text{m}^3$ a $51.90\mu\text{m}^3$, un incremento del 16.35% durante la primera fase G_1 .

Estos resultados indicaron que la presencia de los vectores 3YCp induce un incremento en el volumen medio de gemación independiente de los marcadores nutricionales, *LEU2*, *TRP1* o *URA3*. Por otra parte, el estudio con células recién nacidas mostró que el incremento del volumen de gemación aparece durante la primera fase G_1 celular, sugiriendo por tanto un efecto sobre la maquinaria de *START*, el principal mecanismo que determina el tamaño celular en nuestro modelo.

El volumen celular depende del número de copias de YCp

Un punto relevante fue determinar qué efecto individual tiene cada YCp sobre el incremento del tamaño celular. Por este motivo se diseñó un sistema con el que poder estimar el número de estos vectores y relacionarlo con el volumen de cada célula de una población. Este consistió en la coexpresión de dos proteínas fluorescente bajo el mismo promotor del factor de elongación translacional EF-1 α (TEF) [270], [271]. En

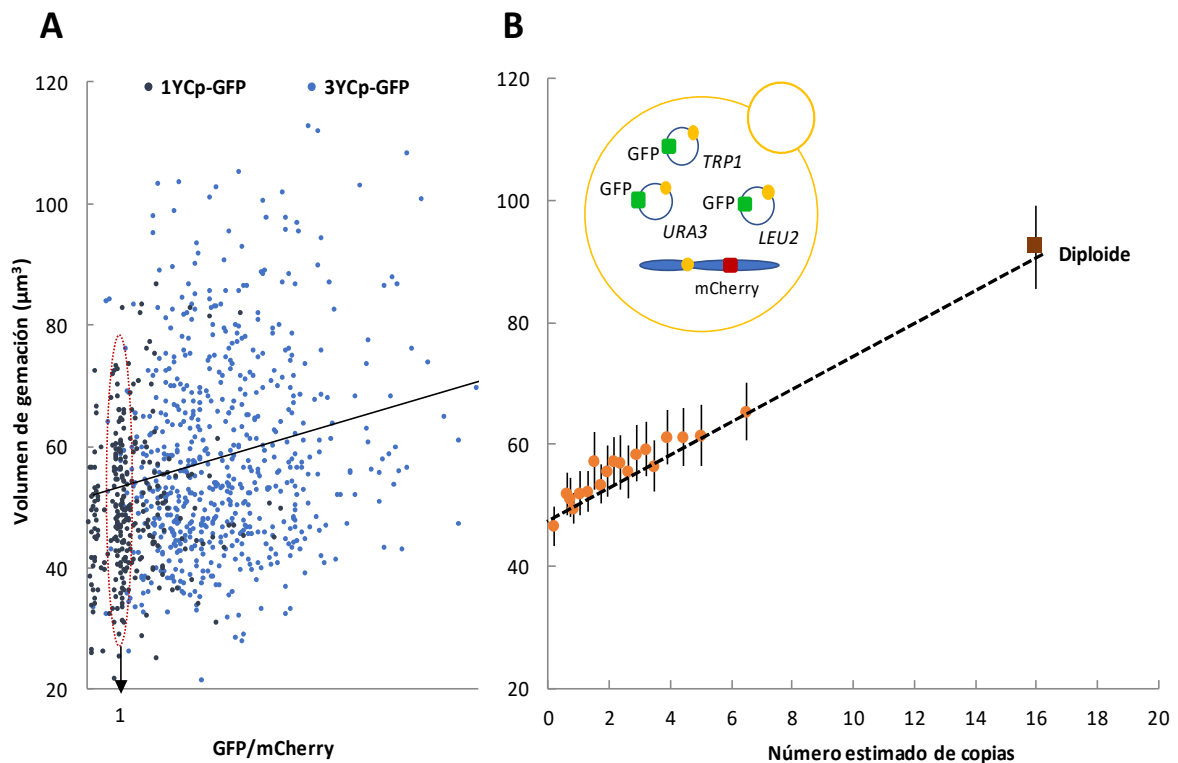


Figura 20: El incremento en volumen de gemación depende del número de copias de YCp.

Relación entre el volumen de células individuales después de su gemación y la ratio de fluorescencia GFP, aportada por los vectores YCp-GFP, entre la fluorescencia mCherry, integrada genómicamente (A). Se utilizan los datos obtenidos de dos cultivos independientes asincrónicos, con la presencia de 1 YCp ($n > 293$, azul oscuro, círculo rojo) o 3YCp ($n > 637$, azul claro), mediante análisis de fotografías obtenidas con microscopio de fluorescencia. Los datos se ordenan según el incremento de la ratio GFP/mCherry. Se indica la línea de tendencia para las dos poblaciones. Estos resultados filtrados mediante *binning* (B), obtenidos mediante la media de paquetes de 50 células, indicándose límites de confianza ($\alpha = 0.05$, barras horizontales) y la línea de tendencia. El número estimado de copias se obtienen mediante la normalización de la ratio GFP/mCherry, considerando 1 unidad como la media de esta experimental entre 3. Se incluye el volumen medio obtenido para células asincrónicas diploides. Se introduce un pequeño esquema donde se indican las auxotrofías aportadas por los plásmidos YCp-GFP independientes.

el caso de los vectores YCp se clonó una copia de *TEFp-GFP* a cada uno de ellos, y para relativizar el nivel de expresión se introdujo una copia de *TEFp-mCherry* en el genoma de la cepa CML128. Así, la *ratio* GFP/mCherry permite estimar el número de copias de nuestro vector para el análisis de su efecto en el volumen celular.

Para poner a prueba este sistema se utilizaron células que contenían 1YCp-*TEFp-GFP* (1YCp-GFP) o 3YCp-*TEFp-GFP* (3YCp-GFP). Representando los

resultados obtenidos para ambas cepas, Figura 20A, se observó como aparece una clara dependencia entre la ratio GFP/mCherry y el volumen celular. Para estimar el número de copias del vector se utilizó la cepa con un único YCp. Las poblaciones celulares se distribuyeron con una gran dispersión en su volumen celular, debida en gran parte a la variabilidad intrínseca de cada célula y a otros sistemas de regulación que lo modulan individualmente en función de su velocidad de crecimiento. Para excluir dicha variabilidad se procesaron los resultados en *binning*, obteniendo datos promedio de pequeños grupos de 50 células (Figura 20B), y se observó como el número de copias de los vectores provoca un incremento lineal del volumen de gemación. Además, la pendiente de la correlación lineal era perfectamente compatible con el volumen de gemación de la célula diploide en función de su número de cromosomas.

Así, estos vectores podrían estar afectando el volumen de gemación mediante parte del mecanismo por el cual las células regulan su tamaño celular en función de la ploidía. Por otra parte, estos experimentos validaron el sistema desarrollado para determinar el número de copias de los vectores YCp, y permitieron su aplicación en los diferentes apartados experimentales de la tesis para desvelar y caracterizar los factores moleculares que regulan *START* en función de la ploidía

El incremento en volumen no responde a un incremento total de DNA

Habiendo observado un fuerte efecto en el número de vectores sobre el tamaño celular, se continuó el estudio para descartar la posibilidad de que esta inducción proviniera de un incremento en la cantidad total de DNA. Por este motivo se introdujeron al estudio los vectores YEp, que se mantienen en una gran cantidad de copias dentro de la célula [248], [249]. Ahora bien, la introducción de estos vectores en la cepa CML128 (Figura 21A) no incrementó el volumen celular de gemación.

Se construyó el vector YEp-*TEFp-GFP* (YEp-GFP) con la idea de analizar el número de copias del vector en células de la cepa CML128 mCherry, y se observó como el incremento de DNA proveniente de los plásmidos YEp no se correlaciona con el volumen celular, Figura 21B. Además, se pudo confirmar que el vector YEp alcanza números de copia muy superiores al YCp.

Este resultado sugirió que el incremento de volumen celular depende del número de copias del vector YCp, y no de la cantidad de DNA aportada sino de algún elemento presente en el vector.

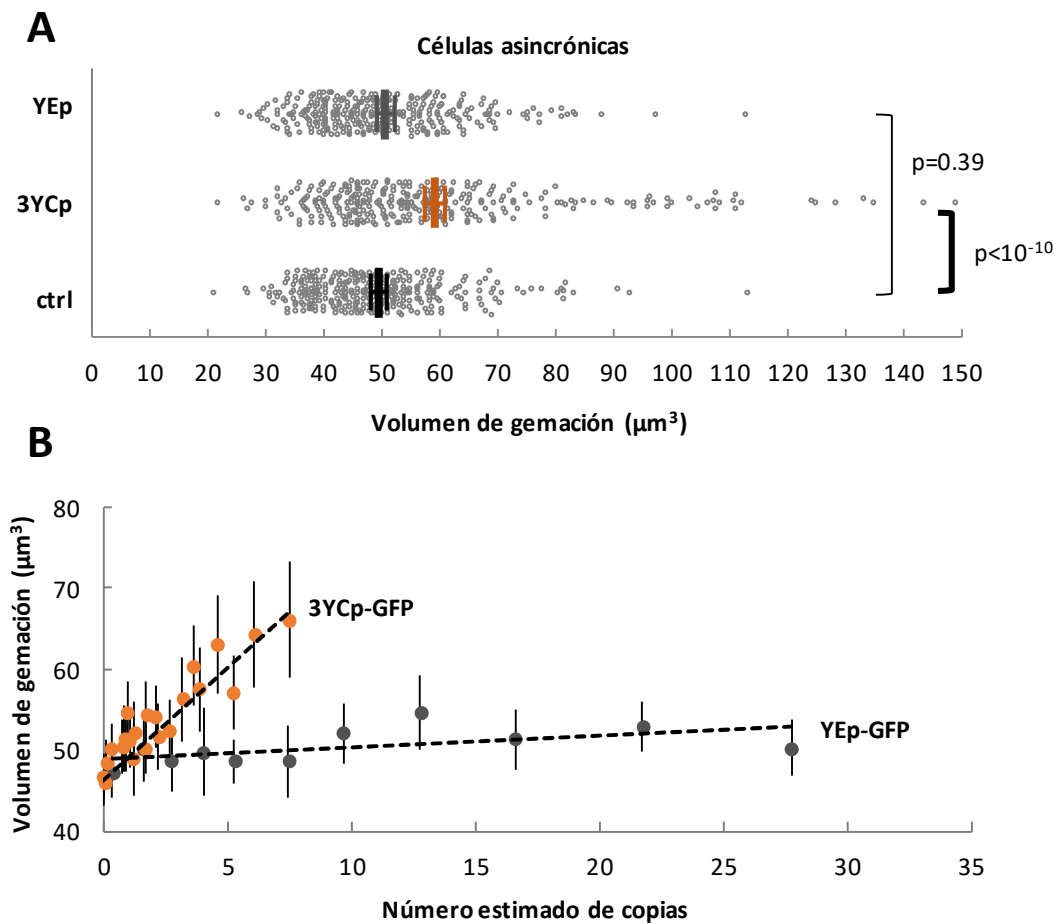


Figura 21: El incremento del volumen celular depende del número de copias de YCp y no de la cantidad de DNA aportada.

Volumen de células individuales durante la gemación en cultivos asincrónicos ($n>300$), en ausencia (ctrl) o presencia de vectores tipo YCp (3YCp) o YEp (A). Se indica la media (línea vertical), límites de confianza ($\alpha=0.05$, líneas horizontales) y el p valor para las medias analizadas indicadas. Relación entre el volumen de células individuales después de su gemación y el número estimado de copias obtenido mediante la normalización de la ratio GFP/mCherry (B). Se utilizan los datos obtenidos de dos cultivos independientes asincrónicos, con la presencia de 3YCp-GFP ($n>430$, naranja) o YEp-GFP ($n>500$, verde), mediante análisis de fotografías obtenidas con microscopio de fluorescencia. Se indica la línea de tendencia para cada población y límites de confianza ($\alpha=0.05$, barras horizontales).

El centrómero, inductor del incremento en el volumen celular

La principal diferencia entre los vectores YCp y los YEp es el sistema por el que estos se duplican. Mientras que el sistema YEp mantiene un gran número mediante un sistema de duplicación basado en $2\mu\text{m}$ [254], [255], los YCp se mantienen en niveles bajos gracias a un sistema ARS y una secuencia centromérica [243]. Por tanto, uno de dos estos elementos debe ser el responsable del incremento en el volumen de gemación.

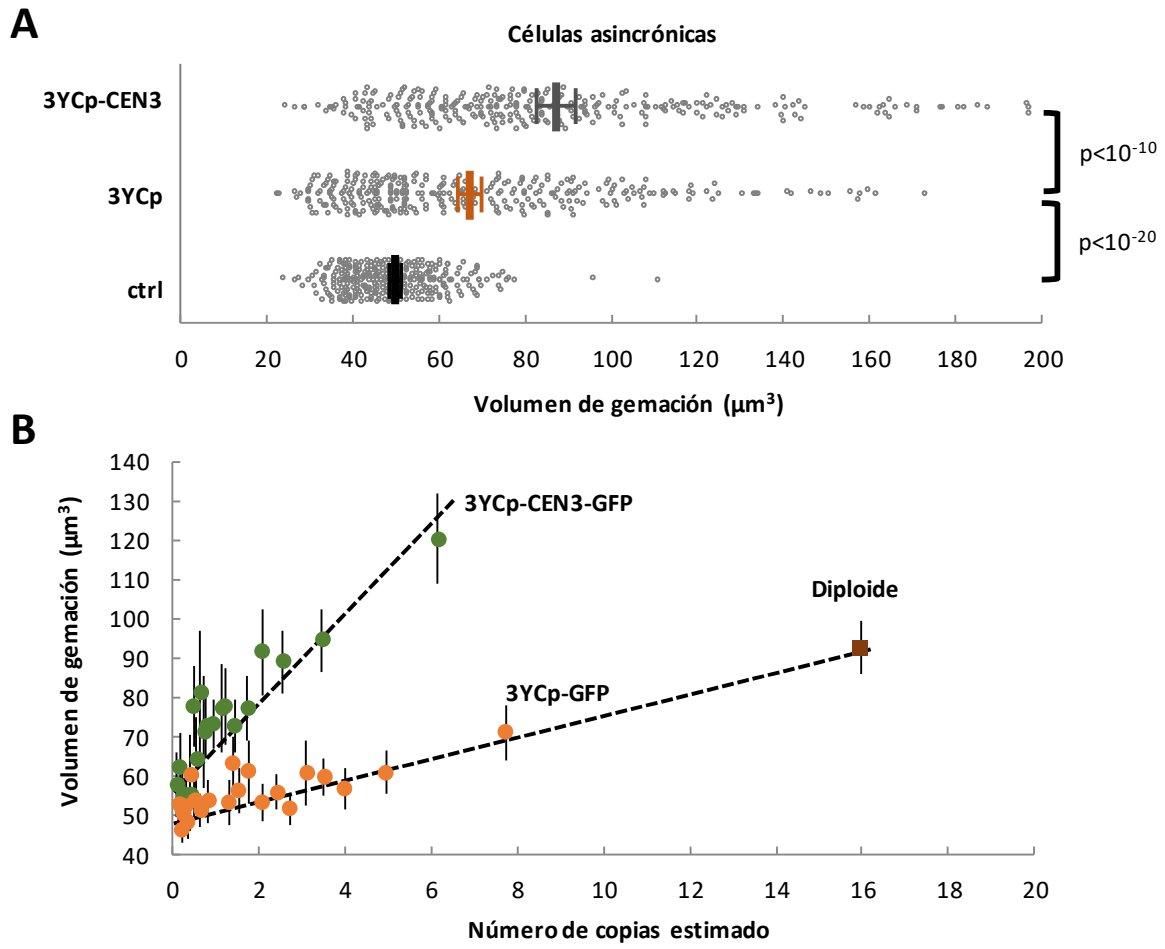


Figura 22: El incremento del volumen celular depende del número centrómeros presentes en los YCp

Volumen de células individuales durante la gemación en cultivos asincrónicos ($n > 300$), en ausencia (ctrl) o presencia de 3YCp o 3YCp-CEN3 (A). Se indica la media (línea vertical), límites de confianza ($\alpha = 0.05$, líneas horizontales) y el p valor para las medias analizadas indicadas. Relación entre el volumen de células individuales después de su gemación y el número estimado de copias obtenido mediante la normalización de la ratio GFP/mCherry (B). Se utilizan datos obtenidos de dos cultivos independientes asincrónicos en glucosa ($n > 600$), con la presencia de 3YCp-GFP (naranja) o 3YCp-CEN3-GFP (verde), mediante análisis de fotografías obtenidas con microscopio de fluorescencia. Se indica la línea de tendencia para cada población y límites de confianza ($\alpha = 0.05$, barras horizontales). Se incluye el volumen medio obtenido para células asincrónicas diploides.

Para comprobar si los elementos centroméricos son los que están promoviendo este fenotipo, se clonó una nueva secuencia centromérica *CEN3* en los vectores YCp, pero bajo la regulación del promotor condicional *GALp* para inhibir la función centromérica por transcripción. Para realizar este experimento se utilizó la cepa W303-1A, y se crecieron las células en presencia de galactosa para inducir el promotor *GALp* y mantener inactivo el *CEN3* asociado. Seguidamente se transfirieron las células a un

medio con glucosa para activar el centrómero *CEN3* adicional por 6-7 ciclos y analizar el tamaño celular. En la Figura 22A se observa como las células con *YCp-GALp-CEN3* (*YCp-CEN3*) indujeron un incremento más exacerbado del tamaño celular respecto al producido por los *YCp*. Las células ctrl con $48.84\mu\text{m}^3$ incrementaron su volumen medio a $67.20\mu\text{m}^3$ al incorporar 3*YCp*, y éstas a su vez incrementaron el volumen de gemación hasta una media de $87.58\mu\text{m}^3$ al incorporar un nuevo centrómero *CEN3* activo. En este caso el incremento causado por 3*YCp* fue del 37,59%, mientras que la presencia de dos centrómeros activos por vector causó un incremento del 79% en el volumen medio de gemación, un valor relativo muy cercano al doble. Se debe indicar que la inactivación de estos centrómeros condicionales no debe ser completa durante su mantenimiento en galactosa, observándose efectos significativos sobre el volumen celular ya en dichas condiciones.

Seguidamente se analizó el efecto en la dependencia de dosis de estos vectores utilizando el sistema de expresión GFP/mCherry. Se clonó una copia de *TEFp-GFP* en cada vector *YCp-GALp-CEN3* y se introdujo una copia de *TEFp-mCherry* en la cepa W303-1A. Como se puede observar en la Figura 22B la respuesta de las células a la presencia de estos nuevos vectores con centrómeros condicionales adicionales, *YCp-GALp-CEN3-TEFp-GFP* (*YCp-CEN3-GFP*), fue más intensa respecto a los vectores *YCp* convencionales, manteniendo la dependencia del volumen celular al número de copias.

Estos resultados sugirieron que el elemento inductor del incremento en el volumen de gemación es el centrómero y, por tanto, no depende de otros elementos presentes en los vectores utilizados. Además, la medida del número de copias refleja realmente la dosis centromérica. Esto consolida la hipótesis de un mecanismo de regulación del volumen celular dependiente de la ploidía, en que el número de centrómeros activos sería el indicador molecular del número de cromosomas.

Los YAC inducen el incremento en el volumen dependiente a su número

A continuación, se contrastaron los resultados obtenidos con los YAC, vectores complejos que mantienen una estructura similar a un cromosoma de levadura [246].

Para modificar y analizar su número de copias se utilizó un vector YAC con un centrómero condicional bajo el promotor *GALp*, en que se introdujo la secuencia *TEFp-GFP*. Tras mantener las células en un medio de cultivo con glucosa en crecimiento asincrónico, se transfirieron a un medio con galactosa para inactivar el

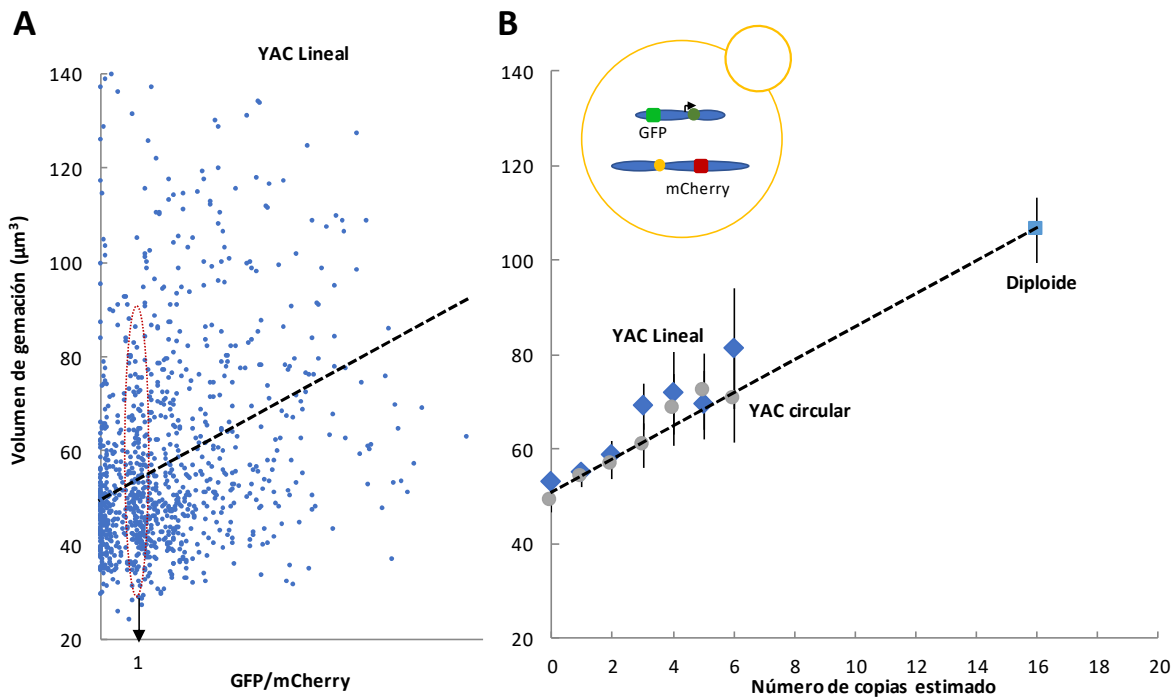


Figura 23: El incremento en volumen de gemación depende del número de copias de YAC.

Relación entre el volumen de células individuales después de su gemación y la ratio de fluorescencia GFP, aportada por el vector YAC-GFP en forma lineal, entre la fluorescencia mCherry, integrada genómicamente (A). Cultivos creciendo asincrónicamente en glucosa ($n > 1045$). Mediante análisis de fotografías obtenidas con microscopio de fluorescencia. Los datos se ordenan según el incremento de la ratio GFP/mCherry. Se indica, con un círculo la población para el contenido individual de 1 copia de YAC, y la línea de tendencia de la población total. Relación entre el volumen de células individuales después de su gemación y la estimación de número de copias de YAC (B). Resultados, filtrados mediante *binning*, de cultivos asincrónicos con YAC-GFP en forma lineal (azul) o circular (grises), indicándose límites de confianza ($\alpha = 0.05$, barras horizontales) y la línea de tendencia. El número estimado de copias se obtienen mediante la normalización de la ratio GFP/mCherry, considerando 1 unidad como la media de esta experimental entre 3. Se incluye el volumen medio obtenido para células asincrónicas diploides. Se introduce un pequeño esquema donde se indican la integración genómica de mCherry y el aportadas por el YAC de GFP independientes.

centrómero por 5 horas (unos 2 ciclos), para que facilitar la segregación asimétrica del vector YAC en la población.

El primer experimento que se realizó fue comprobar que el vector YAC lineal mantiene la dependencia del volumen celular a la ratio GFP/mCherry. En la Figura 23A se observa como la dependencia se mantuvo, y como la agrupación poblacional fue más estricta, muy posiblemente debido a que estos vectores sufren una segregación más homogénea que los vectores YCp.

Al comparar los datos obtenidos para la forma lineal o circular del YAC, agrupados mediante *binning*, Figura 23B, se observó que ambas formas mantienen la dependencia de la dosis centromérica de forma similar. Esta evidencia sugirió que, independientemente la forma en la que sean presentadas las secuencias centroméricas, la célula puede responder con la misma intensidad independientemente de la topología lineal o circular de la molécula de DNA, y daría apoyo a todos los resultados obtenidos con vectores YCp.

Cromosomas dicéntricos condicionales producen un incremento en el volumen de gemación

En los anteriores experimentos se aportaron de forma externa centrómeros en vectores que se mantienen de forma independiente al genoma. Si el centrómero es el principal inductor del cambio en el volumen de gemación, la respuesta debe ser independiente de la procedencia. Por este motivo se consideró la introducción directa de nuevos centrómeros condicionales en los cromosomas propios de la levadura.

En este caso se utilizó la técnica *CRISPR/CAS9* [260], [263], con la que se introdujo una construcción *GALp-CEN4* en los cromosomas IV y VII, utilizando la cepa IMX678. Las células se transformaron y crecieron en condiciones de silenciamiento del centrómero exógeno (en presencia de galactosa) para evitar los efectos tóxicos que provoca la presencia de dos centrómeros activos sobre un mismo cromosoma [244], [245], [272]–[274]. Así, se utilizaron cultivos creciendo en galactosa para obtener células recién nacidas de gradientes de Ficoll, las cuales fueron transferidas a un medio con glucosa durante 90 minutos y seguidamente se analizó su volumen de gemación.

En la Figura 24 se observa que el aporte de dos centrómeros activos, IMX678 *GALp-CEN4::ChIV; GALp-CEN4::ChVII* (CrIV,VII-CEN4), fue suficiente como para causar un incremento en el volumen de gemación respecto de la cepa salvaje (*wt*) en la primera fase G₁. La reducción del tamaño celular en la cepa *wt* fue probablemente debido al cambio de azúcar y al poco tiempo de adaptación a estas nuevas condiciones.

Estos resultados indicaron que la presencia adicional de centrómeros incrementa el volumen de gemación independientemente de su origen, ya sea un aporte en vectores o directamente en el genoma.

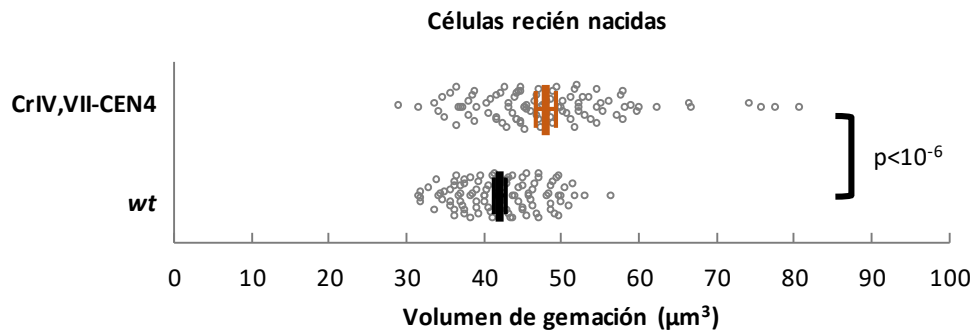


Figura 24: Cromosomas dicéntricos inducen un incremento de volumen celular durante la fase G₁

Volumen de células recién nacidas obtenidas por enriquecimiento en gradientes de Ficoll durante la gemación ($n > 100$), para la cepa salvaje (*wt*) o con cromosomas IV y VII dicéntricos (CrIV,VII-CEN4). Se indica la media (línea vertical), límites de confianza ($\alpha = 0.05$, líneas horizontales) y el p valor para las medias analizadas indicadas.

Por último, cabe destacar que también se observaron efectos en el volumen celular en condiciones de activación del promotor *GALp*, lo que refuerza la idea de que la transcripción a través del centrómero no inhibe totalmente su actividad como tal. Por este motivo, esta cepa con dos cromosomas dicéntricos se utilizó exclusivamente para la determinación del volumen de gemación.

Los YCps comprometen la progresión por el ciclo celular durante la fase G₁

Al estar trabajando con sistemas que contienen centrómeros, aunque nuestros resultados demuestran efectos claros en la primera fase G₁ de células recién nacidas, se consideró la posible activación de otros sistemas que regulasen otras fases del ciclo celular. Se ha demostrado que la presencia de un exceso de centrómeros compromete la funcionalidad del sistema de segregación cromosómica durante la fase M, comportando varios aspectos negativos sobre el ciclo celular [244]. Por ese motivo se consideró de interés analizar los efectos que provocan los vectores YCp especialmente durante el tránsito por G₂/M, fase en la que la segregación cromosómica puede estar comprometida por la presencia de nuevos centrómeros.

Se analizó como las células transitan por el ciclo mediante el análisis de la aparición de células binucleadas, es decir, que finalizan el ciclo. Se sincronizaron las cepas CML128, con 3YCp y sin vectores (ctrl), mediante la aplicación de factor alfa, en fase G₁. A partir de 60 min después de la liberación en medio fresco, se obtuvieron muestras cada 10 minutos y, mediante tinción DAPI, se procedió al conteo del número de células con 1 o 2 núcleos, Figura 25A. Al comparar cómo se comportan las células

con 3YCp respecto del ctrl, se pudo observar un retraso de 5 minutos en la aparición de células binucleadas. En este análisis se incluyeron células *mad3*, que han perdido la capacidad de activar el SAC, el *checkpoint* de G₂/M, en caso de existir problemas de bi-orientación y/o cohesión en el huso acromático en metafase [275], y en ellas no se observó ningún retraso en presencia de 3YCp. Esto sugirió que el retraso causado por 3YCp implica el SAC.

A continuación, se procedió a analizar el comportamiento poblacional en su contenido de DNA celular mediante FACS, que indica cómo se distribuyen las células de la población por las diferentes etapas del ciclo celular. Se utilizaron cultivos asincrónicos de la cepa W303-1A, con vectores simples o con centrómeros condicionales, y se obtuvo su perfil mediante la tinción con ioduro de propidio. Los resultados muestran como las células presentan un incremento del pico G₁ en presencia de 3YCp, Figura 25B. Este incremento fue más exacerbado en el caso de los plásmidos con dos centrómeros (YCp-CEN3).

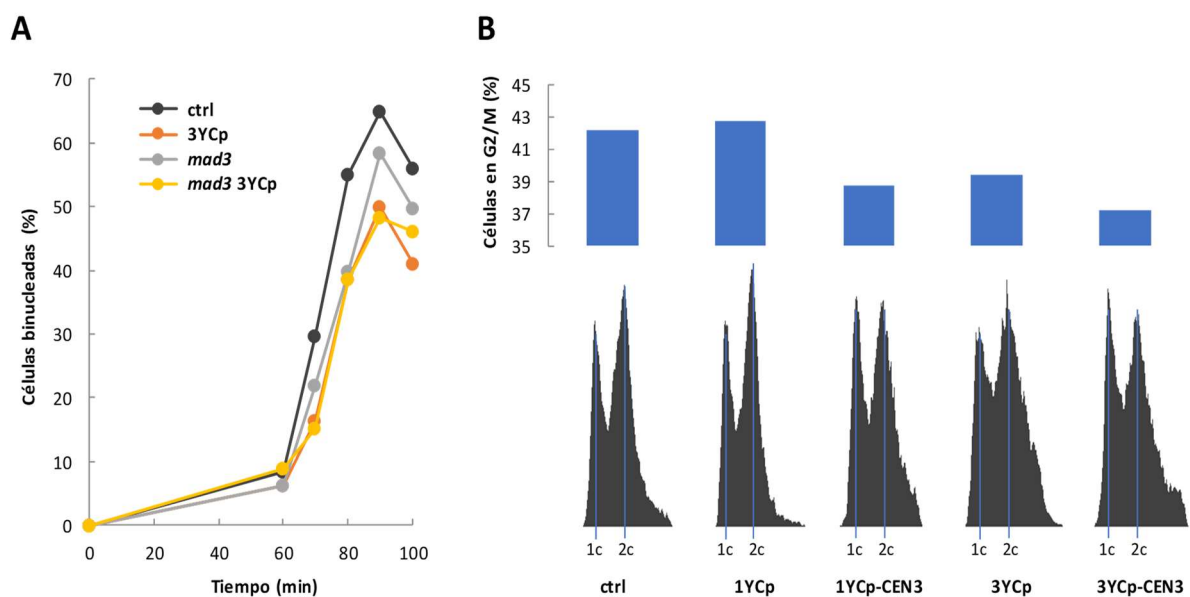


Figura 25: La población de células en G₁ incrementan al presentar un mayor número de centrómeros observándose un ligero efecto durante G₂/M.

Perfil de aparición de células binucleadas (A), obtenidos desde cultivos asincrónicos de las cepas indicadas, sin (ctrl) o con 3YCp, que fueron sincronizados mediante factor alfa en G₁ y liberados en medio nuevo. Analizando desde el minuto 60 y cada 10 minutos, la presencia de células binucleadas mediante su tinción con DAPI y conteo mediante microscopio de fluorescencia (n>200, representadas en %). Perfil obtenido mediante FACS de cultivos asincrónicos (B), de las cepas sin presencia (ctrl) o con los vectores indicados, se indica la población con 1c o 2c (líneas verticales azules). Y se analiza la cantidad de células en G₂/M en % analizando el pico obtenido para el perfil de FACS.

Estos resultados sugirieron que, aunque hay un cierto efecto durante el tránsito de G₂/M, este efecto queda enmascarado por el mayor impacto en la fase G₁, ya que un mayor número de centrómeros incrementa claramente la fracción de células en G₁. Por otro lado, y tomando conjuntamente los resultados descritos hasta ahora, se puede concluir que, de alguna forma, el número de centrómeros podría estar modificando la maquinaria que regula *START* y dar lugar a un incremento del tamaño crítico.

El centrómero compromete el funcionamiento de la maquinaria de *START*

Tras constatar que la presencia de nuevos centrómeros en la célula está afectando al tránsito durante la fase G₁, se propuso analizar sobre qué elementos está actuando. La fase G₁ se puede separar en dos etapas. Una primera citoplasmática que conlleva la retención de Cln3 en el RE y la participación de chaperonas multifuncionales en su liberación para permitir su acumulación en el núcleo celular [56], [57], [276]. Esta etapa citoplasmática establece una dependencia del volumen crítico celular a la velocidad de crecimiento. La segunda etapa es nuclear, y en ella Cln3 libera Whi5 para activar el regulón G₁/S en *START* e iniciar el ciclo celular [52], [269].

Con el objetivo de determinar si las secuencias centroméricas regulan la progresión por G₁ en la etapa citoplasmática, se analizaron células por microscopía *time-lapse* para determinar el volumen crítico en *START* y su dependencia de la velocidad de crecimiento para cada célula. En la Figura 26A se muestran los datos obtenidos para las cepas CML128 ctrl y con 3YCp, observándose como la dependencia del volumen a la velocidad de crecimiento se mantiene, aunque como era de esperar se produjo un incremento en el volumen de *START* promedio de la población.

Seguidamente se analizaron los efectos aportados por la presencia de dos cromosomas dicéntricos. Tras mantener un crecimiento asincrónico en galactosa para la cepa *wt* y la cepa con cromosomas IV y VII dicéntricos condicionales, las células fueron transferidas a un medio con glucosa. En este caso, Figura 26B, se observó que la presencia de estos cromosomas dicéntricos activos provoca un efecto similar, aunque más reducido respecto al observado para la presencia de los vectores YCp.

Estos resultados indican que el número de centrómeros no afecta a la dependencia entre el volumen de gemación y la velocidad de crecimiento, cuya base molecular se relaciona como ya se ha dicho con la etapa citoplasmática de la

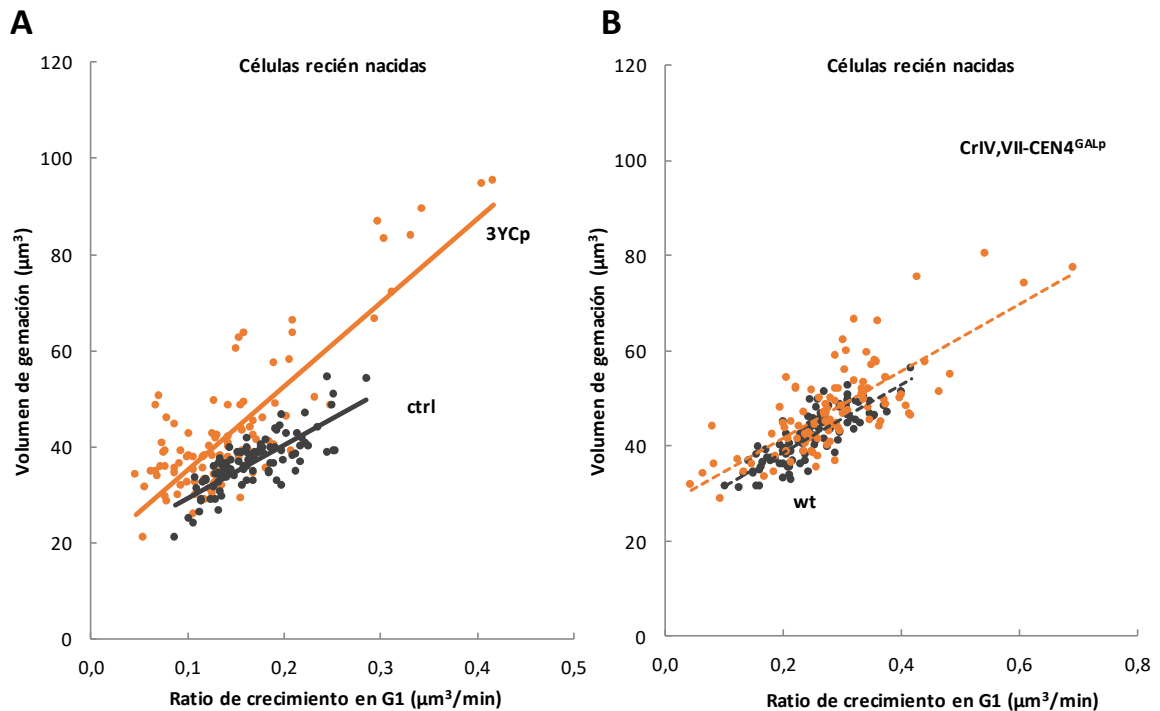


Figura 26: La presencia extra de centrómeros no modifica la *ratio* de crecimiento en G₁.

Relación entre el volumen de células individuales al iniciar la gemación y su ratio de crecimiento en G₁ obtenido mediante un microscopio *time-lapse*. A partir de cultivos enriquecidos en células recién nacidas mediante gradientes de Ficoll, (A) para la cepa salvaje, sin (ctrl, gris) o con presencia de 3YCp (naranja); o (B) para la cepa salvaje (*wt*, gris) o con presencia de cromosomas IV y VII dicéntricos (CrIV,VII-CEN, naranja). Se indica la ausencia incluyéndose la línea de tendencia.

progresión en G₁, y sugieren en cambio una intervención en la etapa nuclear de *START*.

A continuación, se procedió a estudiar qué efectos tienen la presencia de 3YCp en condiciones de carencia de los elementos que activan el sistema *START* en el núcleo: la ciclina Cln3, que actúa como inductor, y Whi5 como represor [47]–[50].

El primer estudio que se realizó fue comprobar cómo se ven afectadas cepas de CML128 mCherry con distintas alteraciones en *CLN3* y *WHI5* en condiciones de crecimiento asincrónico, Figura 27. La carencia de Whi5 no implicó una pérdida de respuesta a la presencia de los 3YCp, y mantuvo el incremento relativo observado en el volumen de gemación para la forma *wt*. Ahora bien, la pérdida del activador Cln3, aunque incrementa en dicho volumen, suprimió totalmente el incremento en respuesta

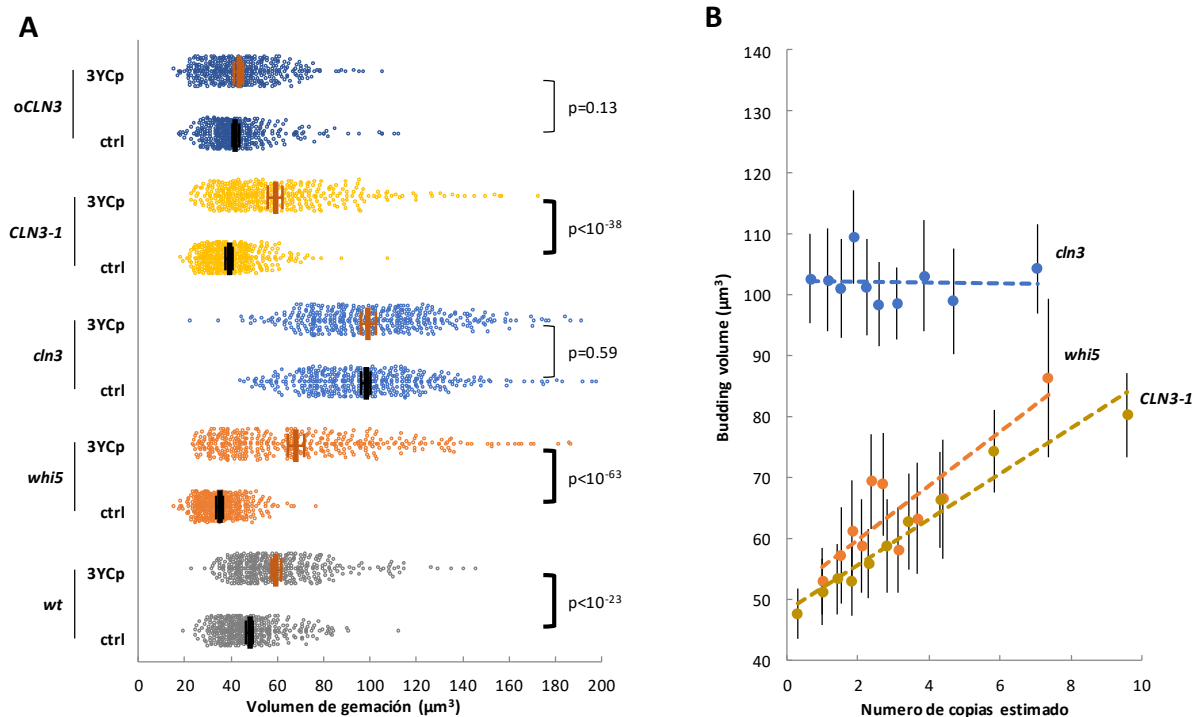


Figura 27: Efectos de la dosis centromérica en reguladores de *START*

Volumen de células individuales durante la gemación en cultivos asincrónicos (A), en ausencia (ctrl) o presencia de 3YCp, para la cepa salvaje (*wt*) o con las deleciones indicadas ($n > 400$). Se incluye la media (línea vertical), límites de confianza ($\alpha = 0.05$, líneas horizontales) y el p valor para las medias analizadas indicadas. Relación entre el volumen de células individuales después de su gemación y el número estimado de copias obtenido mediante la normalización de la ratio GFP/mCherry (B). Se utilizan datos obtenidos de tres cultivos independientes asincrónicos de las cepas indicadas ($n > 500$), con la presencia de 3YCp-GFP. Obtenida mediante análisis de fotografías obtenidas con microscopio de fluorescencia. Se indica la línea de tendencia para cada población y límites de confianza ($\alpha = 0.05$, barras horizontales).

a la presencia de los 3YCp. Estos resultados sugirieron que el efecto de la presencia de una dosis extra centromérica está afectando a *Cln3*. A continuación, se analizaron qué efectos se observan si se trabaja con una versión más estable de *CLN3*, *CLN3-1* [49], y con una superexpresión de *CLN3* en su forma salvaje. Mientras que la superexpresión de la forma *wt* suprimió por completo el incremento de volumen debido a la presencia de centrómeros, la forma *CLN3-1* no tuvo ningún efecto y se comportó como el control.

Seguidamente se estudió la dependencia de estas poblaciones a la dosis centromérica. En la Figura 27B se representan los resultados obtenidos, observándose que tanto las cepas *whi5* como *CLN3-1* mantuvieron la dependencia a

la dosis centromérica observada anteriormente en las cepas *wt*, mientras que ésta desapareció completamente en el caso de *cln3*.

Estos datos sugirieron que los centrómeros están actuando sobre la proteína Cln3. Dado que la superexpresión de *CLN3* consigue niveles nucleares de la proteína mucho mayores que la forma *CLN3-1*, nuestros resultados sugirieron también que el control mediado por el número de centrómeros radica muy probablemente en el núcleo.

Los centrómeros reducen la acumulación nuclear de Cln3

Considerando a Cln3 como diana final de este mecanismo inducido por los centrómeros, se procedió a estudiar qué efecto estaba promoviendo la presencia de nuevos centrómeros en la célula sobre el comportamiento del activador de *START* por microscopía *time-lapse*.

Para realizar este experimento se utilizó una forma modificada de Cln3 que permita su seguimiento por fluorescencia, ya que al ser una proteína altamente inestable sus niveles son demasiado bajos para su detección en su forma salvaje [48], [49], [54], [197]. Por este motivo se utilizó la cepa KSY083-5, que contiene la fusión *mCitrina-CLN3-11A*, insertada genómicamente. Esta forma de Cln3 es hipoactiva e hiperestable, debido a la pérdida de 11 sitios de fosforilación, implicados en su actividad y degradación [192].

El primer experimento que se realizó fue para comprobar que nuestro fenotipo continuaba estando presente bajo la actividad de esta forma de Cln3 (Figura 28A), se pudo confirmar un fuerte incremento dependiente de los 3YCp. La hipoactividad inicial condujo a que la cepa sin 3YCp obtuviera una media de $61.77\mu\text{m}^3$, un 30% mayor que su forma salvaje. Ahora bien, al incorporar los 3YCp su media fue de $95.71\mu\text{m}^3$, un incremento de casi el 85% de su volumen control.

A continuación, se procedió a hacer un seguimiento de la acumulación nuclear de esta proteína mediante fluorescencia por microscopía *time-lapse*. Como se puede observar en la Figura 28B, la acumulación nuclear de Cln3 se vio desplazada a un volumen mucho mayor en el caso de células con centrómeros adicionales. Pero a su vez, ambas cepas necesitaron llegar a niveles similares de Cln3 en el núcleo para activar *START* e iniciar el ciclo celular, reforzando la idea de que los niveles de inhibidor Whi5 a superar son asimismo similares en ambos casos.

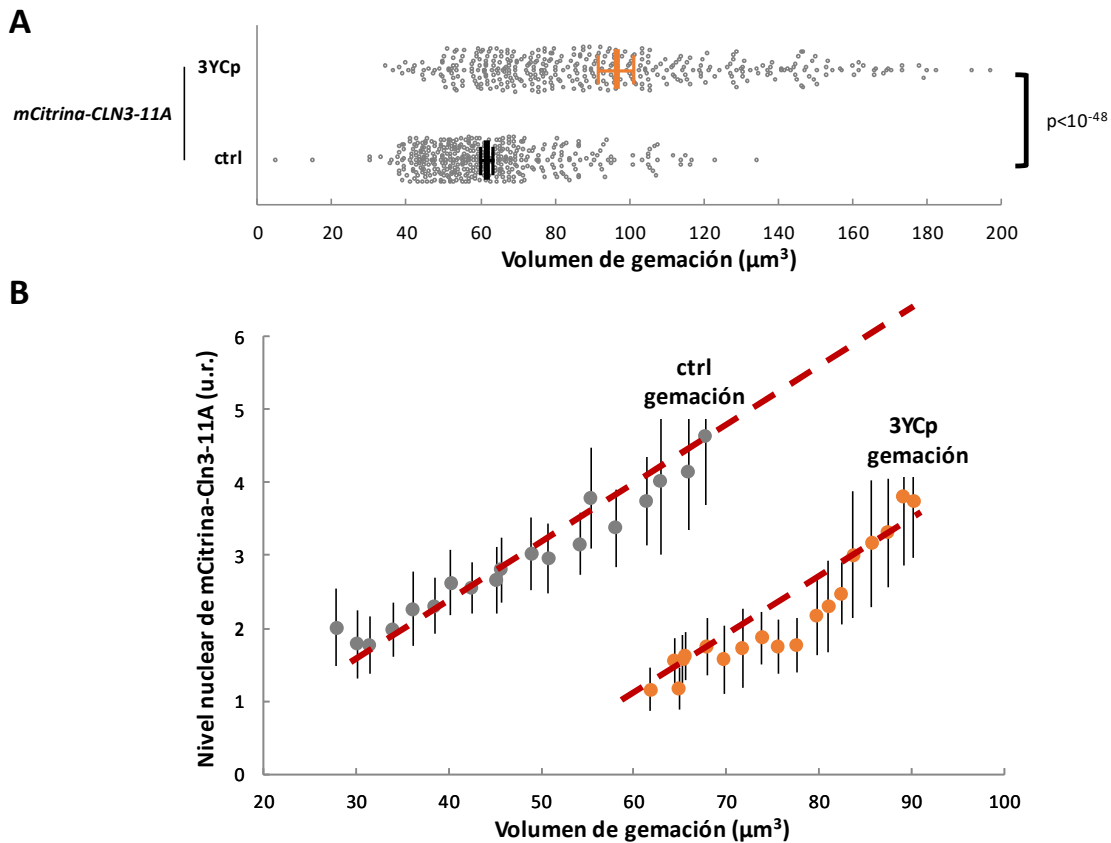


Figura 28: La presencia de 3YCp retrasa la acumulación de Cln3 nuclear suficiente para iniciar *START*

Volumen de células individuales durante la gemación en cultivos asincrónicos ($n > 400$), en ausencia (ctrl) o presencia de 3YCp, para la cepa con presencia de la forma mCitrina-Cln3-11A (A). Se indica la media (línea vertical), límites de confianza ($\alpha = 0.05$, líneas horizontales) y el p valor para las medias analizadas indicadas. Nivel nuclear de mCitrina-Cln3-11A obtenidos mediante el estudio de fluorescencia mCitrina en núcleo y normalizado con su nivel citoplasmático (en unidades relativas, u.r.) (B). Los cultivos utilizados crecieron en ausencia (ctrl) o presencia de 3YCp (rojo) ($n > 100$). Se indica el tiempo de gemación y se representa la tendencia para cada cultivo (línea roja).

Estos resultados indican que la presencia de centrómeros adicionales compromete la normal acumulación de Cln3 en el mismo núcleo. Ello podría deberse *a priori* a dos razones: reducción del importe al núcleo, o a una mayor degradación en el núcleo. Dado que la acumulación nuclear de Cln3 depende del sistema general de importación de proteínas al núcleo, que es constitutivo, es poco razonable pensar en esta opción. Así pues, los centrómeros podrían estar modulando los sistemas de degradación de Cln3 en el núcleo, donde es ubiquitinada por SCF y la proteína Cdc4 [82], [277].

Las proteínas reguladoras centroméricas (CRPs) afectadas por la dosis centromérica

Para el estudio de nuestro mecanismo pareció interesante encontrar el elemento transmisor que respondiera al número de centrómeros y que transmitiera la información a Cln3. Por este motivo se investigaron elementos reguladores de señales conocidos que interactúan con el cinetocoro. Se consideró una buena opción investigar los elementos del SAC ya que se conocen varias vías de regulación [133]–[136], están presentes durante la fase G₁ [146]–[149], y se habían encontrado vinculaciones entre estos elementos y Cln3 mediante técnicas de doble híbrido [278].

Se estudió el volumen crítico en células asincrónicas que carecen de los diferentes elementos del SAC en la cepa CML128 mCherry, Figura 29. Las células mutantes *mad2*, *mad3*, y *bub3* perdieron totalmente la capacidad de incrementar el

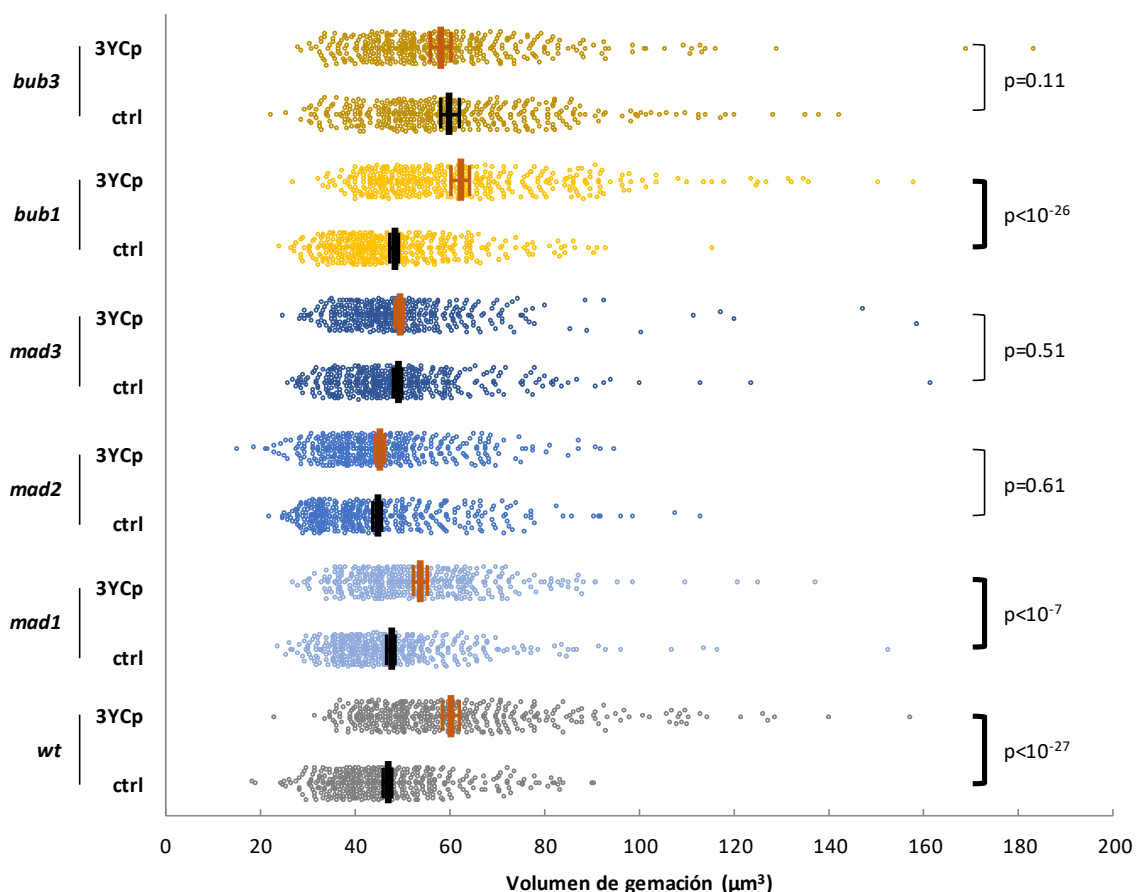


Figura 29: Efectos de la dosis centromérica al volumen de gemación en CRPs

Volumen de células individuales durante la gemación en cultivos asincrónicos (n>400), en ausencia (ctrl) o presencia de 3YCp, para la cepa salvaje (*wt*) o con las deleciones indicadas. Se indica la media (línea vertical), límites de confianza ($\alpha=0.05$, líneas horizontales) y el p valor para las medias analizadas indicadas.

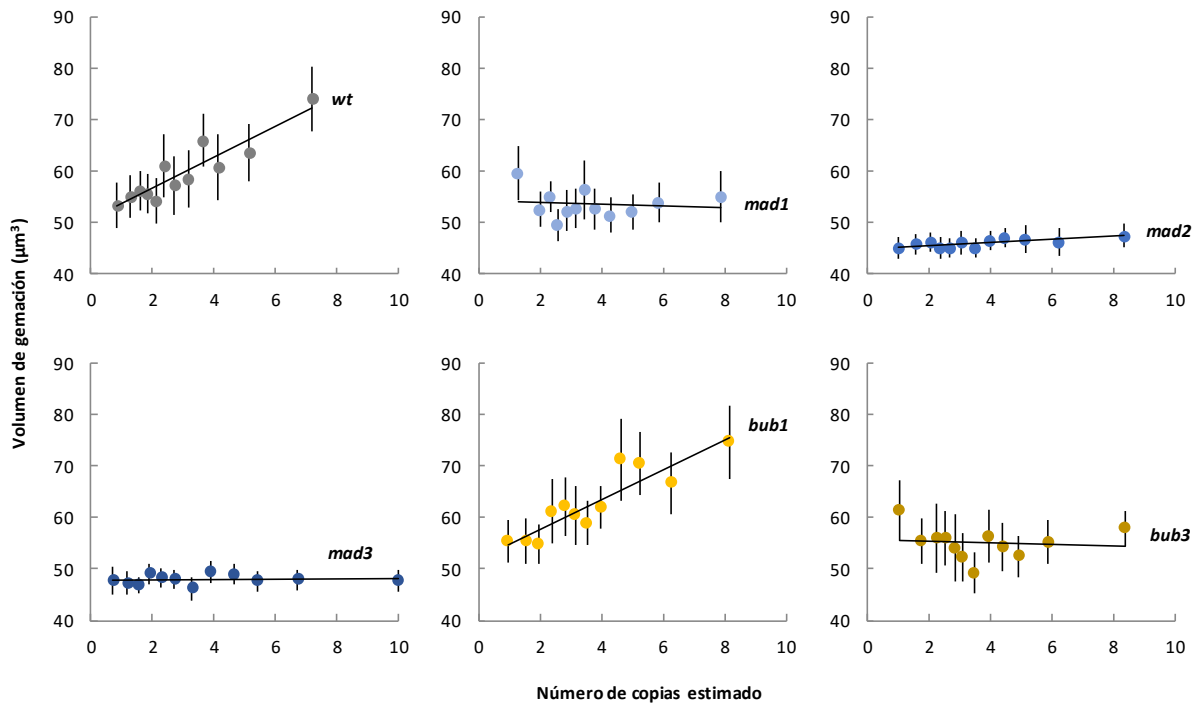


Figura 30: Los elementos del SAC pierden la dependencia en la dosis centromérica

Relación entre el volumen de células individuales después de su gemación y el número estimado de copias obtenido mediante la normalización de la ratio GFP/mCherry. Se utilizan los datos obtenidos de seis cultivos independientes asincrónicos ($n > 600$), para las cepas salvaje (*wt*) o con las deleciones indicadas. Se incluye la línea de tendencia para cada población y límites de confianza ($\alpha = 0.05$, barras horizontales).

volumen de gemación en presencia de 3YCp. Únicamente se observó un incremento de volumen en las cepas *bub1* y *mad1*. Tras esto se procedió a determinar si esta pérdida de respuesta en el volumen celular respondía a una pérdida en la dependencia del volumen celular a la dosis centromérica.

Se analizó la dependencia a la dosis centromérica en estas mismas cepas incluyendo los vectores 3YCp-*TEFp-GFP* (3YCp-GFP) y, mediante la estimación del número de copias, Figura 30, se observó como en el caso anterior una pérdida completa de la dependencia del volumen de gemación al número de centrómeros por parte de las cepas *mad2*, *mad3*, y *bub3*, y en este caso también *mad1*.

Estos resultados permiten sugerir que Mad2, Mad3 y Bub3 deben estar actuando o participando como transmisores de la información centromérica hacia el mecanismo de *START*. En el caso de Mad1 se observa que las células mutantes mantienen el incremento del volumen celular en presencia de los 3YCp, pero sin un efecto

cuantitativo, lo que sugeriría que Mad1 podría representar un factor con un papel lateral en esta regulación.

La regulación del tamaño por ploidía no depende exclusivamente de CRPs

Para estudiar el impacto de la regulación y señalización de los elementos CRP en función de la dosis centromérica, se estudió el volumen de células haploides y diploides cuando tienen carencia de los elementos Mad3 y Mad2.

Primero se analizó el volumen medio de poblaciones de crecimiento asincrónico en su forma haploide, cepa CML128, Figura 31A, y se observó que la forma *mad3* reduce ligeramente su volumen, siendo este significativo respecto la forma *wt*. Las

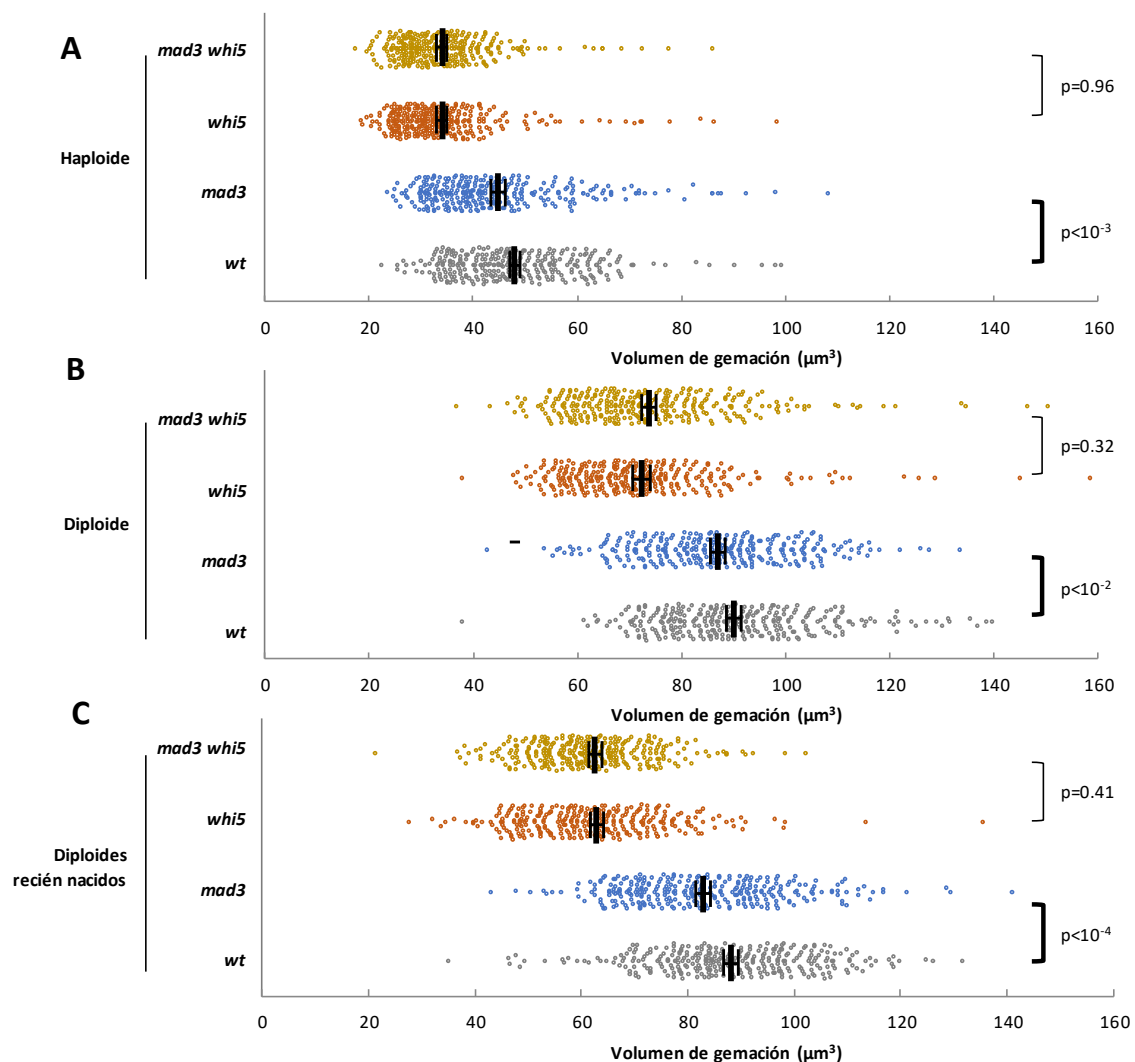


Figura 31: La pérdida de Mad3 permite una reducción del volumen celular.

Volumen de células individuales durante la gemación en cultivos asincrónicos (n>400) para haploides (A), diploides (B) y diploides recién nacidos obtenidos mediante enriquecimiento con gradientes de Ficoll (C), para las cepas salvaje (*wt*) o con las deleciones indicadas. Se indica la media (línea vertical), límites de confianza (α=0.05, líneas horizontales) y el p valor para las medias analizadas indicadas.

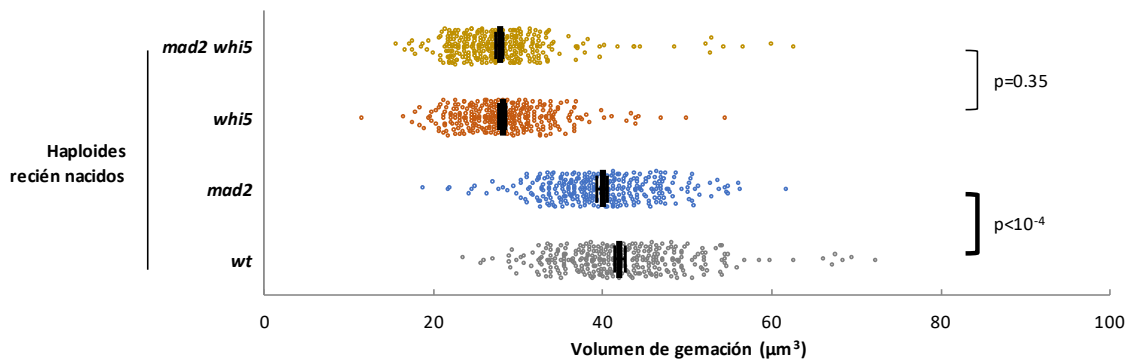


Figura 32: La pérdida de Mad2 permite una reducción del volumen celular.

Volumen de células individuales durante la gemación en cultivos asincrónicos ($n > 400$) para haploides recién nacidos obtenidos mediante enriquecimiento con gradientes de Ficoll, para las cepas salvaje (*wt*) o con las deleciones indicadas. Se indica la media (línea vertical), límites de confianza ($\alpha = 0.05$, líneas horizontales) y el p valor para las medias analizadas indicadas.

células diploides, Figura 31B, presentaron el incremento de volumen esperado por el incremento de ploidía, y la cepa *mad3* redujo significativamente su volumen, como ocurrió en las formas haploides. En la Figura 31C se observa como la cepa *mad3* presentaba esta reducción de volumen ya durante la primera fase G_1 después de nacer; y en la Figura 32, se puede apreciar que las células *mad2* también mostraron una reducción significativa de su volumen de gemación promedio.

Estos resultados sugirieron que ambos elementos están participando en la regulación del volumen celular dependiente de la dosis centromérica durante G_1 . Sin embargo, la deficiencia en Mad2 o Mad3 no reduce el volumen de las células diploides al nivel de las haploides, por lo que no serían el único sistema implicado en la regulación del tamaño celular por ploidía. Se puede encontrar en la literatura que Whi5 podría estar implicada en la determinación del tamaño por ploidía, aunque no explicaría el volumen final de la célula diploide ya que dos copias de Whi5, en células haploides, no incrementan el tamaño suficiente al esperado para una célula diploide al incorporar dos copias del gen *WHI5* [279]. Por este motivo, se estudiaron las cepas carentes de Mad2 y Mad3 conjuntamente con la pérdida de Whi5. Se observó que, para todas las células, ya carezcan de los elementos CRP o no, y si se elimina Whi5, el volumen se reduce drásticamente sin observarse diferencias significativas respecto al volumen de las células *whi5*, Figuras 31 y 32.

Estos resultados sugirieron que la pérdida de Whi5 reduce el volumen medio de la célula hasta un mínimo nivel, por lo que no podría observarse un efecto aditivo. Podría ser que la forma *whi5* obtenga el volumen más pequeño para las células,

imposibilitando la viabilidad en condiciones más reducidas. Además, como curiosidad cabe indicar que las células *mad2 whi5* son viables, algo que contradice el estudio mediante esporulación de esta cepa, indicando que este efecto únicamente sea relevante en la meiosis [280].

La superexpresión de CRPs no recapitula la respuesta a los centrómeros

Una vez observado que los CRPs están interactuando para modificar el tamaño celular dependiendo de la presencia de centrómeros adicionales, se determinó si estos permiten activar la respuesta mediante una superexpresión controlada.

Para este experimento se clonaron las formas Mad2 y Mad3 salvajes, y la fusión Mad2-Mad3, que ha sido descrita como la forma activa del MCC [281], todas bajo la inducción del promotor *GALp* en un vector tipo YCp. Todas estas construcciones se transformaron en una cepa con capacidad de inducir la expresión del promotor galactosa mediante la activación con estradiol en la cepa CML128-Pgen361 [259]. Para determinar su efecto durante G₁ se utilizaron células recién nacidas obtenidas de gradientes de Ficoll, las cuales fueron transferidas de nuevo a un cultivo, inducidas 30 min más tarde con 200nM de estradiol y, tras 60 min, se fotografiaron y analizaron.

Se observó un ligero incremento del volumen para la superexpresión de Mad2 y Mad3, Figura 33, siendo únicamente Mad3 quien produjo resultados significativos. Si

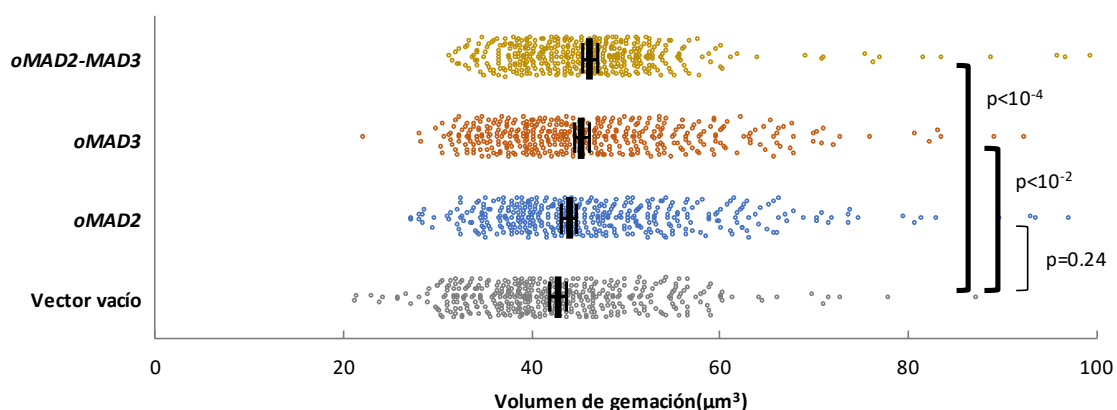


Figura 33: La superexpresión de elementos del MCC incrementan ligeramente el volumen celular

Volumen de células individuales durante la gemación en cultivos asincrónicos (n>400), células recién nacidas obtenidos mediante enriquecimiento con gradientes de Ficoll, con la superexpresión de los elementos indicados, con 200nM estradiol durante 60 min. Se indica la media (línea vertical), límites de confianza ($\alpha=0.05$, líneas horizontales) y el p valor para las medias analizadas indicadas.

RESULTADOS

se analizan los resultados para la fusión de ambas proteínas se observa un efecto aditivo.

Estos resultados indican que estos elementos no activan *per se* el mecanismo de regulación por centrómeros, pudiendo ser que no dependa de la cantidad de estos elementos o que tenga lugar una saturación del agente activador. Es interesante observar que la fusión de ambos componentes tuvo un efecto más elevado indicando que muy posiblemente ambos componentes han de estar participando conjuntamente, pero no siendo suficientes como para recapitular la respuesta observada por la presencia de centrómeros adicionales.

Efectos de la superexpresión de Mad3-KEN30AAA y Mad3-5A

Dado que no se pudo activar el mecanismo mediante la superexpresión, se consideró como una opción modificar Mad3 en busca de un posible efecto positivo sobre el mecanismo.

Por una parte se modificó su capacidad de activar el *checkpoint* de G₂/M mediante la eliminación del motivo KEN30 [152]. Y además se incorporó a nuestro estudio una forma de Mad3 en las que se habían eliminado los posibles sitios de fosforilación por la quinasa Cdc28 (S15, T275, T438, T457, T479), mediante su sustitución por una alanina. Tras analizar los resultados obtenidos para la superexpresión de estas formas de Mad3, Figura 34, se observó que tanto la forma

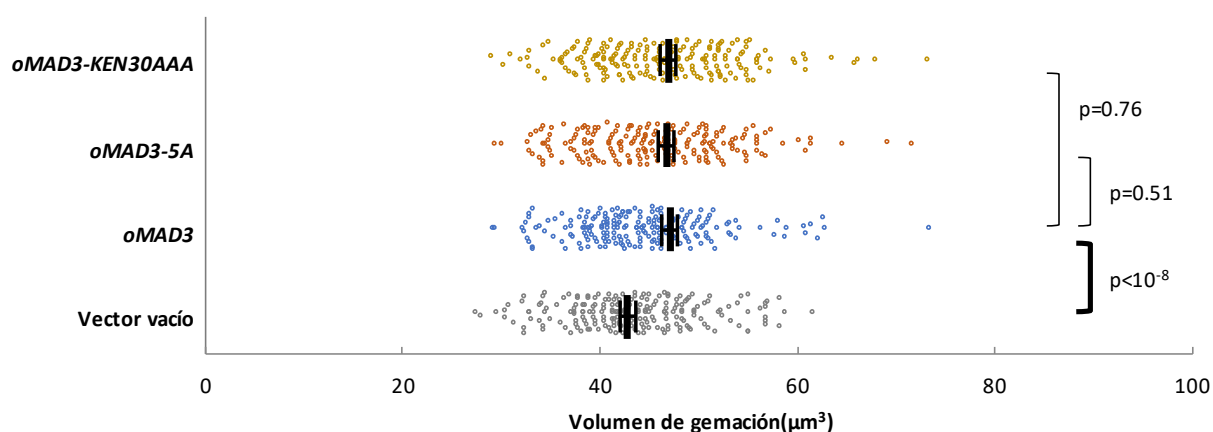


Figura 34: La pérdida de actividad SAC de Mad3 es independiente a al incremento del volumen celular

Volumen de células individuales durante la gemación en cultivos asincrónicos (n>200) células recién nacidas obtenidos mediante enriquecimiento con gradientes de Ficoll, con la superexpresión de los elementos indicados, con 200nM estradiol durante 60 min. Se indica la media (línea vertical), límites de confianza ($\alpha=0.05$, líneas horizontales) y el p valor para las medias analizadas indicadas.

Mad3-KEN30AAA como la Mad3-5A mantienen el incremento en el volumen observado con la superexpresión de la forma salvaje.

Estos resultados sugirieron que el incremento de volumen que induce Mad3 no depende de su función en el SAC, y que los sitios de fosforilación no estarían implicados en la actividad de Mad3 sobre el mecanismo de regulación del volumen celular dependiente de la dosis centromérica.

El SCF está implicado en el incremento de tamaño dependiente del número de centrómeros.

Como se ha demostrado anteriormente en este estudio, la presencia de un número adicional de centrómeros implica la reducción de Cln3 nuclear. Esto podría ser explicado por un incremento en la degradación de Cln3 en el núcleo dependiente de Cdc4, que identificaría como sustrato a Cln3 para ser ubiquitinada por el complejo SCF [82].

Por este motivo se introdujeron los vectores YCp-*TEFp-GFP* (YCp-GFP) en cepas con una versión termosensible de las proteínas Cdc4, Cdc34 y Cdc53 (su eliminación de las células las hace inviables), e incluyéndoles una copia de *TEFp-mCherry* genómica. De esta manera se pudo determinar si su volumen celular mantiene la dependencia de la dosis centromérica.

Las diferentes cepas se cultivaron a 25°C y seguidamente fueron transferidas a un medio a 37°C durante 6h antes de obtener los resultados para el volumen crítico de gemación y la *ratio* GFP/mCherry. Los resultados para las diferentes cepas, Figura 35, fueron contrastados con el resultado para una cepa *wt* de forma individual. El volumen celular se normalizó a las respectivas estirpes control sin vectores YCp, para eliminar los efectos que las mutaciones tienen *per se* sobre el volumen celular, y se observó una clara reducción de la dependencia a la dosis centromérica para las estirpes *cdc4-1* y *cdc34-1*, Figuras 35A y 35B, respectivamente. En el caso de la estirpe *cdc53-1* se observó una tendencia similar a la observada para la forma *wt*.

Estos resultados indican que el sistema de degradación SCF interviene en la respuesta de las células a la presencia de una dosis más elevada de centrómeros, y apoyan la idea por la que el número de centrómeros sería capaz de modular la degradación de Cln3.

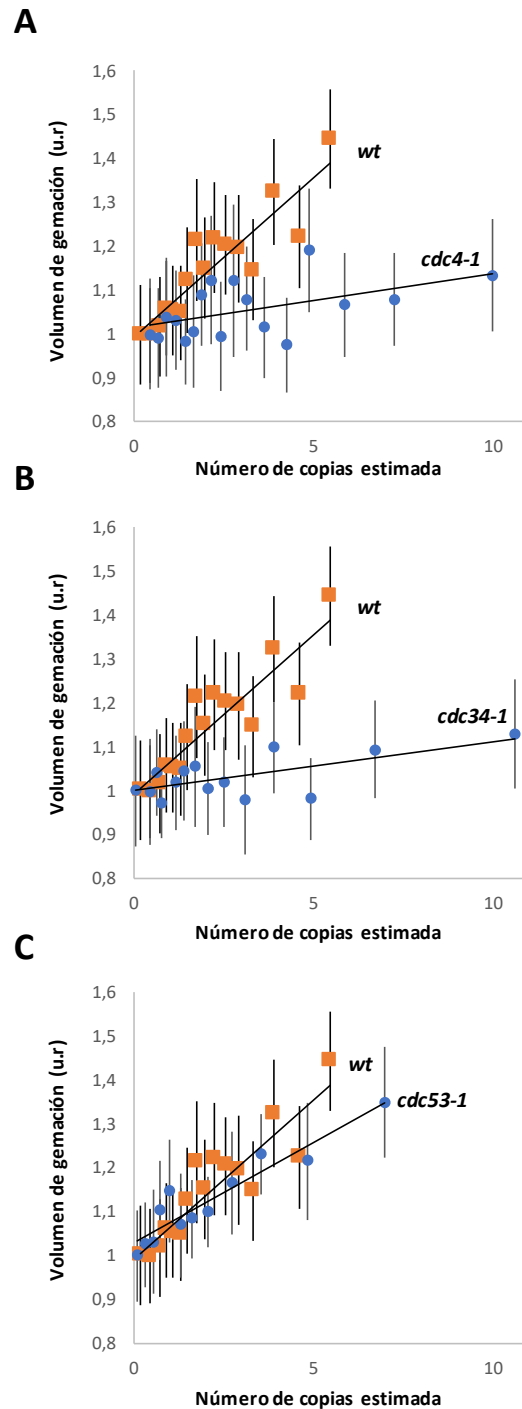


Figura 35: Los elementos de SCF afectados por la dependencia a la dosis centromérica

Relación entre el volumen de células individuales después de su gemación y el número estimado de copias obtenido mediante la normalización de la ratio GFP/mCherry el volumen de gemación con la cepa *wt* (u.r). Se utilizan los datos obtenidos de cuatro cultivos independientes asincrónicos ($n > 1000$), para las cepas salvaje (*wt*, naranja) o (A) *cdc4-1* (azul), (B) *cdc34-1* (azul) y (C) *cdc53-1* (azul). Se incluye la línea de tendencia para cada población y límites de confianza ($\alpha = 0.05$, barras horizontales).

Mad3 necesita a Bub3 para mediar el incremento de volumen dependiente del número de centrómeros

En el estudio genético para los diferentes CRPs se ha observado como los elementos del MCC, Mad3 y Bub3 son importantes para mantener la respuesta a la presencia de YCp. Gracias a la vinculación entre Skp1, un componente clave del sistema de

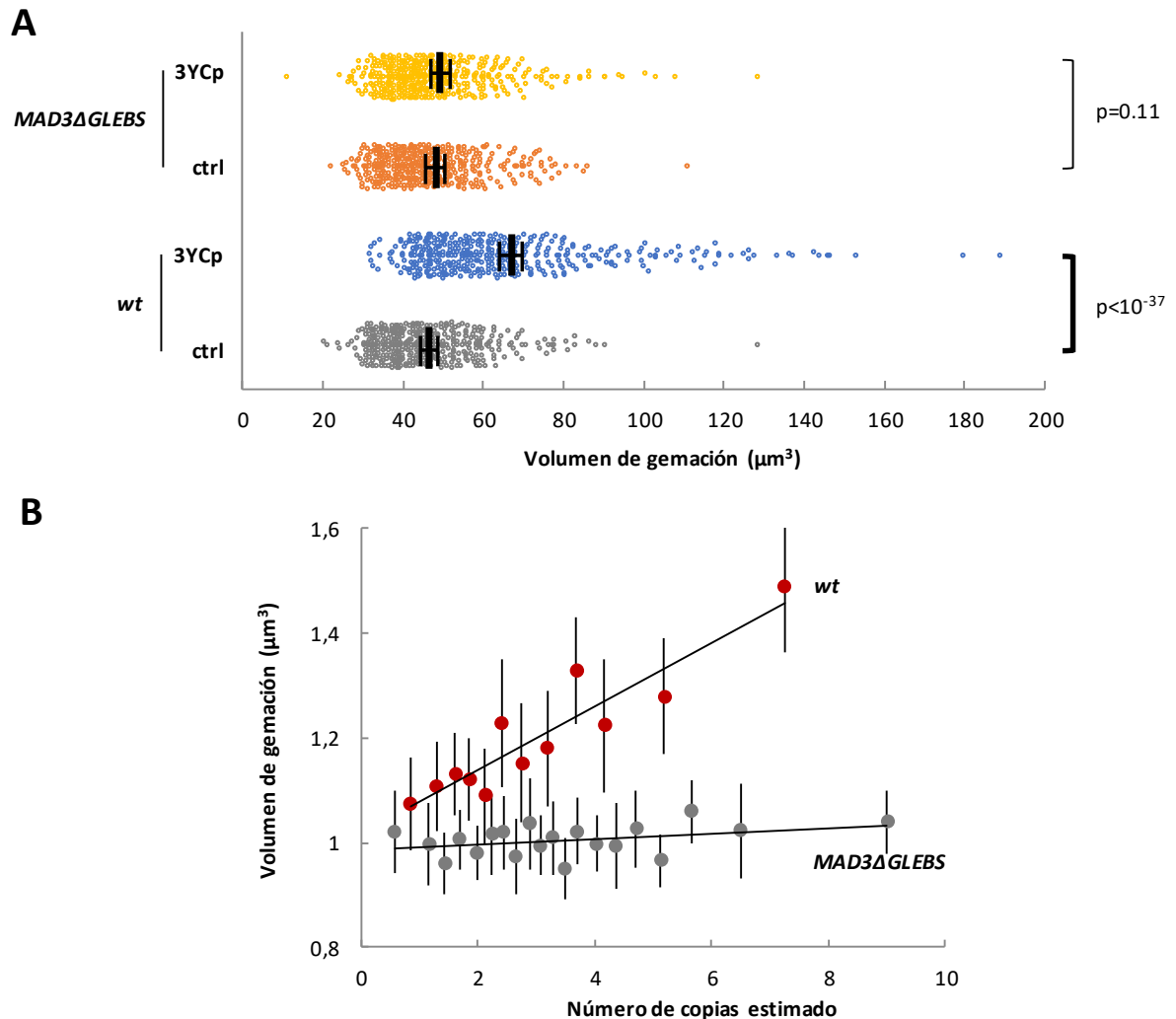


Figura 36: El volumen celular pierde la dependencia a la dosis centromérica al perder la interacción entre Mad3 y Bub3

Volumen de células individuales durante la gemación en cultivos asincrónicos (A), en ausencia (ctrl) o presencia de 3YCp, para la cepa salvaje (*wt*) o con la delección indicada ($n > 400$). Se incluye la media (línea vertical), límites de confianza ($\alpha = 0.05$, líneas horizontales) y el p valor para las medias analizadas indicadas. Relación entre el volumen de células individuales después de su gemación y el número estimado de copias obtenido mediante la normalización de la ratio GFP/mCherry (B). Se utilizan los datos obtenidos de dos cultivos independientes asincrónicos de las cepas indicadas ($n > 1000$), con la presencia de 3YCp-GFP. Obtenida mediante análisis de fotografías obtenidas con microscopio de fluorescencia. Se indica la línea de tendencia para cada población y límites de confianza ($\alpha = 0.05$, barras horizontales).

degradación SCF, con Bub1 a través de Bub3 [277], se consideró una buena opción estudiar qué respuesta tienen las células a la pérdida de la interacción entre Bub3 y Mad3. Para esto se procedió a la eliminación del motivo GLEBS de Mad3 que permite su unión a Bub3 [162].

Tras confirmar que la expresión de Mad3 Δ GLEBS es similar a la proteína wt, se estudió el volumen de gemación en cultivos asincrónicos de las cepas wt y Mad3 Δ GLEBS, con y sin la presencia de 3YCp. Mientras que la cepa wt mostró el incremento esperado en volumen celular en presencia de 3YCp, la cepa Mad3 Δ GLEBS fue totalmente insensible, Figura 36A.

Observando estos resultados se procedió a determinar si esta cepa ve reducido su incremento de volumen por la pérdida de la dependencia a la dosis centromérica. Se modificaron las cepas mediante la integración genómica de una copia de *TEFp-mCherry* y se introdujeron los vectores 3YCp-*TEFp-GFP*. Se obtuvieron los resultados para la *ratio* entre GFP/mCherry y se contrastaron con el volumen de gemación, Figura 36B. Los resultados indicaron una clara pérdida de la dependencia centromérica para las células con Mad3 Δ GLEBS.

Estos resultados sugirieron que Mad3 depende de la interacción con Bub3, mediante el motivo GLEBS, para promover el incremento del volumen celular y mantener su dependencia a la dosis centromérica. Dada la implicación del motivo GLEBS en las interacciones con Skp1, nuestros resultados sugieren una conexión directa entre SCF y las proteínas Bub3 y Mad3 para regular la degradación de Cln3.

Mad3 interacciona *in vivo* con Cln3 y Cdc4.

La conexión fenotípica observada en la regulación del volumen dependiente de la dosis centromérica para los elementos Cln3, Mad3 y Cdc4, indicaron la posibilidad de que estos constituyan una verdadera vía de regulación. Para demostrar esta idea se estudió en primer lugar la interacción *in vivo* entre Cln3 y Mad3, de los que se encuentran referencias de su interacción mediante ensayos de doble híbrido [278] y Mad3-Cdc4.

Para realizar este experimento se utilizó la cepa YJD43-1, *cdc4-1 grr1 CLN3-13Myc* que carece de la actividad de las proteínas *F-Box* de degradación de Cln3 [82], lo que permite fácilmente obtener cantidades de ciclina altas.

Tras obtener pellets de 30OD₆₀₀ desde cultivos asincrónicos a 23°C en YPGal (para la expresión de Cdc4 Δ F-Box y Mad3), se desactivó la actividad de Cdc4.1

pasándolo a un nuevo medio YPGal a 37°C durante 2h. Seguidamente el cultivo fue recolectado, disgregado mecánicamente y centrifugado para eliminar restos celulares insolubles. El sobrenadante obtenido fue incubado con *Glutathione-Sepharoes beads* para su unión a Mad3-GST o Cdc4-GST.

En la Figura 37 se observan los resultados para esta primera interacción. Se consideró un correcto funcionamiento del experimento ya que se pudo observar la ausencia de Cln3-13Myc en el control negativo (GST) y su clara presencia en el positivo (Cdc4-GST) [82]. Por lo que se refiere a nuestras proteínas de interés, se detectó claramente Cln3-13Myc en la forma Mad3-GST salvaje, pero unos niveles mucho más reducidos en la forma Mad3ΔGLEBS-GST.

Este resultado sugirió que Mad3 puede interactuar *in vivo* con Cln3, y que ésta depende de la interacción con Bub3 y, posiblemente, Skp1, lo que refuerza la idea de que estos elementos del MCC están colaborando conjuntamente como en el SAC.

Seguidamente, se estudió la posibilidad de que Mad3 pudiera estar conectado a través de Skp1 con SCF y Cdc4. En la literatura se encuentran conexiones entre Skp1,

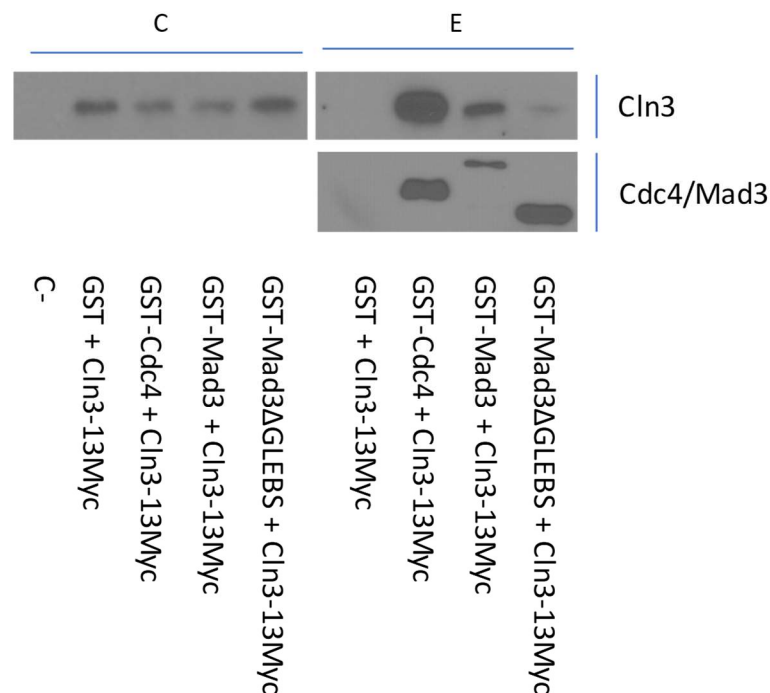


Figura 37: Mad3 interacta con Cln3 *in vivo*

Estudio de la interacción *in vivo* Cln3-Mad3. Análisis por *western blot* de extractos celulares (C) y eluatos de la purificación por afinidad a GST (E). La cepa utilizada es W303 *cdc4-1 grr1 CLN3-13Myc*, incluyendo pYES2 para la expresión de GST, GST-Cdc4 o GST-Mad3 (*wt* o ΔGLEBS). En la parte superior revelada con αMyc, para visualizar Cln3. Parte inferior αGST para visualizar Cdc4 o Mad3.

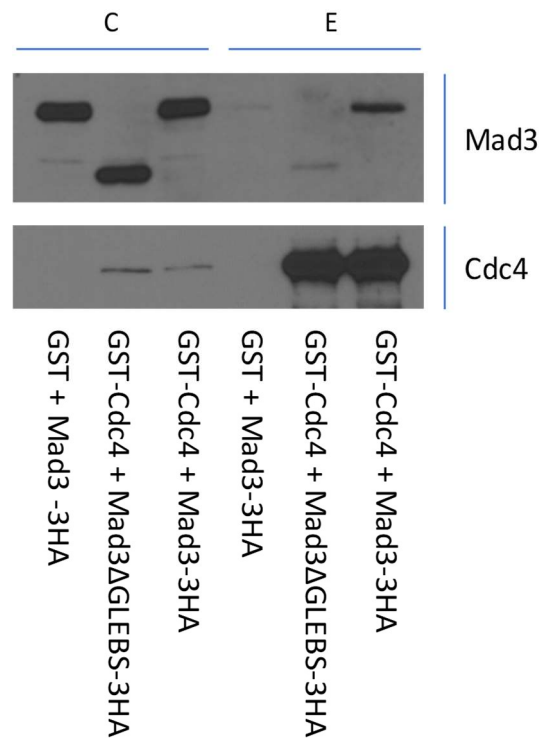


Figura 38: Mad3 interacciona con Cdc4 *in vivo*

Estudio de la interacción *in vivo* Cdc4-Mad3. Análisis por *western blot* de extractos celulares (C) y eluatos de la purificación por afinidad a GST (E). La cepa utilizada es CML128 *MAD3-3HA* (*wt* o Δ *GLEBS*), incluyendo pYES2 para la expresión de GST-Cdc4. En la parte superior revelada con α HA, para visualizar Mad3. Parte inferior α GST para visualizar Cdc4.

que se presenta en los centrómeros y Bub1, y esto se daría mediante una interacción con Bub3 [277]. Por este motivo se estudió la posible interacción Mad3-Cdc4.

En este caso se expresó la proteína Cdc4-GST en las cepas salvajes con marcaje genómico de Mad3-3HA y Mad3 Δ GLEBS-3HA, en YPGal durante 16h a 30°C, y se procedió a la purificación de proteínas con marcaje GST procedente de un pellet celular de 30 OD₆₀₀. Se observó un alto nivel de Mad3-3HA en la muestra Cdc4-GST, Figura 38. En el caso de la forma Mad3 Δ GLEBS se observó un nivel mucho más bajo, sugiriendo una menor eficiencia de unión.

Este resultado sugirió que existe una interacción *in vivo* entre Mad3-Cdc4, y que ésta dependería de la presencia de Bub3, como ocurre entre Bub1-Skp1. Ello daría un fuerte impulso a la idea de que las proteínas de regulación centromérica Mad3 y Bub3 participan en los mecanismos de degradación nuclear de Cln3 para adecuar el tamaño celular a la ploidía.

DISCUSIÓN

En este trabajo se ha demostrado que el tamaño celular muestra una clara dependencia de la dosis centromérica en las células, independientemente de su procedencia, manteniendo una clara correlación con el incremento de tamaño dependiente de la ploidía. Este fenómeno ocurre de forma coherente con un mecanismo de regulación propio celular. Tras este análisis con el aporte artificial de centrómeros se identificó al centrómero y sus componentes como principal inductor de este mecanismo.

La presencia de más centrómeros impacta directamente sobre los mecanismos de *START*, siendo Cln3 la diana final. Se observa una reducción de la acumulación de esta ciclina en el núcleo que se traduce en un alargamiento de la fase G₁, un incremento del tamaño celular en *START* y una mayor cantidad de células transitando esta fase celular. Además, se observa como proteínas de señalización centromérica como son los componentes del MCC: Mad2, Mad3 y Bub3 están involucrados en la señalización de este sistema de regulación por dosis centromérica. En este estudio se muestra una clara relación entre Cln3 y Mad3, pudiendo demostrar su interacción y que esto conllevaría a una regulación por degradación de Cln3 en el núcleo por los principales elementos del SCF, que se puede vincular a su actividad al centrómero, como ha sido sugerido en un sistema orquestado por la proteína Cdc4 [82]. Estas nuevas evidencias permiten sugerir un complejo sistema de control del tamaño celular regulado por la ploidía, en el que Mad2, Mad3, Bub3 y Cdc4 formarían un complejo conjuntamente con los elementos del SCF para la estimular la degradación de Cln3 en función del número de centrómeros y su capacidad para ensamblar los diferentes elementos, o activarlos por algún mecanismo desconocido, que se discute en detalle más adelante.

El centrómero, de la toxicidad a la regulación del tamaño celular

Tras la construcción de pequeño vectores de DNA circulares con sistema centromérico [105] aparecieron los primeros estudios sobre el impacto del incremento de centrómeros en la célula mediante el aporte artificial con plásmidos. Tras forzar la presencia de un alto número de plásmidos con centrómero observaron un gran número de complicaciones que comprometen la viabilidad celular [239], [244]. Los cultivos que crecen con 5 vectores de estas características, muestran una reducción en el crecimiento celular, una reducción de la viabilidad celular de hasta un 59%, la aparición de células con formas aberrantes, y una elevada pérdida de plásmidos y

cromosomas, lo que conllevaba una alta inestabilidad genómica y sugería problemas durante la mitosis [244]. El retraso de la fase G₂/M fue analizado mediante centrómeros condicionales en mini-cromosomas lineales, lo que permitió deducir que las proteínas del MCC, Mad1, Mad2 y Mad3, están implicadas en estos fenotipos. Al carecer de ellas las células no presentaban el retraso en G₂/M, indicando un problema de segregación cromosómica [272].

En este trabajo se utilizó un número menor de vectores centroméricos, 3YCp, lo que posiblemente evitó en buen parte dichos aspectos negativos. Se observa un claro incremento en el volumen celular, pero no la aparición de formas aberrantes, en función del número de centrómeros introducidos a la célula. También se observaron efectos negativos, aunque muy reducidos, durante la fase G₂/M (Figura 25A). Ahora bien, al analizar cuidadosamente el tamaño de células individuales, así como su distribución por FACS, se observó que el principal efecto se da previa la transición G₁/S. Las poblaciones estudiadas incrementaron la cantidad de células que transitan en G₁ y este efecto incrementa con el número de centrómeros nuevos (Figura 25B).

Los defectos en G₁ que se han observado por incremento limitado de centrómeros condicionales podrían ser comparables a los obtenidos por incremento cromosómico, como ha sido descrito para células aneuploides con un número más alto de cromosomas [282], [283]. El retraso observado en estas células ha sido correlacionado con una interferencia en la actividad de la maquinaria de *START*, observándose un retraso en la acumulación de Cln3, un retraso en la salida de Whi5 del núcleo y un retraso en la acumulación del mRNA de *CLN2* [283]. Estos efectos podrían deberse a los desequilibrios en la estequiometría de complejos que tiene lugar en células aneuploides, que en nuestro caso se puede descartar por la aproximación experimental elegida en que solamente se manipuló el número de centrómeros. En particular, los centrómeros condicionales incorporados mediante vectores de forma artificial y el doble marcaje con proteínas fluorescentes han permitido analizar el tamaño celular en situaciones de primer ciclo y observar con claridad efectos dependientes de dosis, sugiriendo muy claramente una regulación sobre la maquinaria de *START*.

Tamaño por ploidía y la maquinaria de *START*

La razón biológica del por qué el incremento de ploidía compromete a la célula a un incremento en su tamaño se desconoce por completo en la actualidad [216]. Desde

un punto de vista evolutivo el incremento de ploidía no establece un claro beneficio en los estudios realizados, pero se sugiere que este fenómeno permite a las células incrementar la variabilidad genómica y la acumulación de mutaciones puntuales, incrementando así las posibilidades de adaptación a nuevas condiciones ambientales [224], [284].

En esta tesis se centra en cómo la ploidía produce un incremento del tamaño celular de una forma regulada. Se puede establecer un mecanismo que induce un incremento celular dependiente del número de centrómeros y cómo éste estaría regulando la maquinaria de *START*. Este sistema iniciado desde los centrómeros, y promovido por los elementos señalizadores del centrómero, induciría una reducción de los niveles de la ciclina Cln3. No obstante, aunque necesarios, los elementos estudiados no son suficientes para explicar el control de tamaño por ploidía, pues la delección de estos genes solamente produce una reducción limitada del tamaño de la célula diploide, y no lo reduce al de la célula haploide (Figura 31 y 32). Por tanto, este mecanismo basado en el número de centrómeros probablemente opera en paralelo a

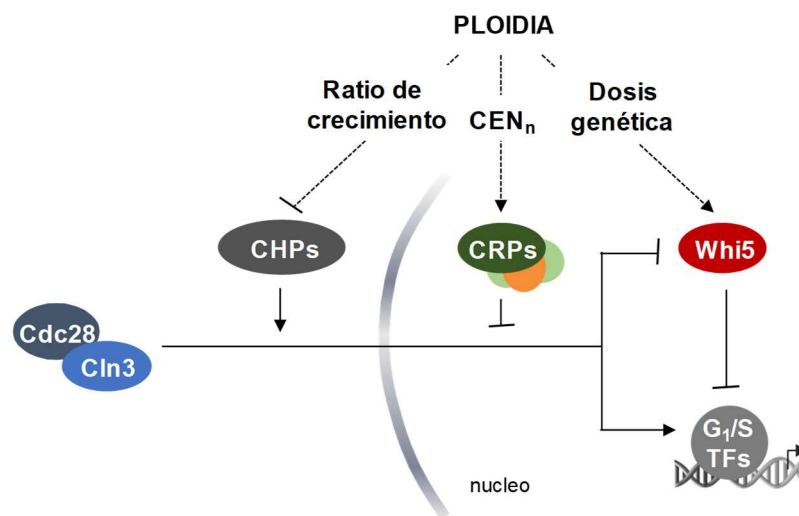


Figura 39: Modelo cooperativo para la regulación del tamaño celular mediante ploidía

Modelo simplificado en el que participarían tres vías de regulación para establecer un sistema correcto y robusto para la determinación del tamaño dependiente de la ploidía. El primero en participar dependería del sistema de la *ratio* de crecimiento en el que las chaperonas (CHPs) intervienen en la liberación del complejo Cln3/Cdc28 y transporte hacia el núcleo. Una vez en el núcleo el sistema de regulación dependiente de la dosis centromérica, promovería una mayor dificultad de su concentración gracias a la participación de las CRPs que inducirán una degradación de Cln3. Finalmente, el complejo estaría bajo regulación por la concentración del represor Whi5, que dependerá del anterior ciclo celular donde la dosis genética presente incrementara sus niveles y será necesaria la dilución de esta para que se active *START* de forma irreversible.

otros sistemas para mantener el tamaño celular acorde con la ploidía (Figura 39). Aunque el elemento central de regulación sería Cln3, varios estudios muestran una implicación importante del elemento *Whi5* y su dosis génica en la determinación del tamaño celular. El estudio del grupo de Jan M. Skotheim concluye que, mientras la síntesis de *Whi5* tiene lugar durante la fase S/G₂/M previa, la dilución por crecimiento en la fase G₁ sería el mecanismo clave para fijar un tamaño crítico en el cual *Whi5* alcanzase un nivel umbral mínimo. [192]. Así, el nivel de expresión de *Whi5* es estrictamente dependiente de dosis génica, pero, en cambio, ni la adición de una copia adicional del gen *WHI5* a la célula haploide ni su delección en la diploide eliminan la diferencia de tamaño entre ellas (Figura 40). Estos resultados apuntan a la existencia de otros mecanismos, como el propuesto en esta tesis. Los resultados con células diploides carentes de *Whi5* y *Mad3* plantean que la situación es de hecho más compleja, pues, aunque la reducción del tamaño es muy clara, tampoco en este caso se consigue el tamaño de la célula haploide (Figura 31 y 32).

Otra posibilidad proviene de la implicación de chaperonas, *Ydj1* y *Ssa1,2*, en *START*, concretamente para facilitar la acumulación nuclear del complejo Cln3/Cdc28 y establecer un tamaño crítico dependiente de velocidad de crecimiento [17], [18]. Para estudiarla, durante la tesis se intentó analizar los efectos sobre el tamaño celular de la carencia conjunta de *Mad3* e *Ydj1*, pero, por motivos que se desconocen, las células

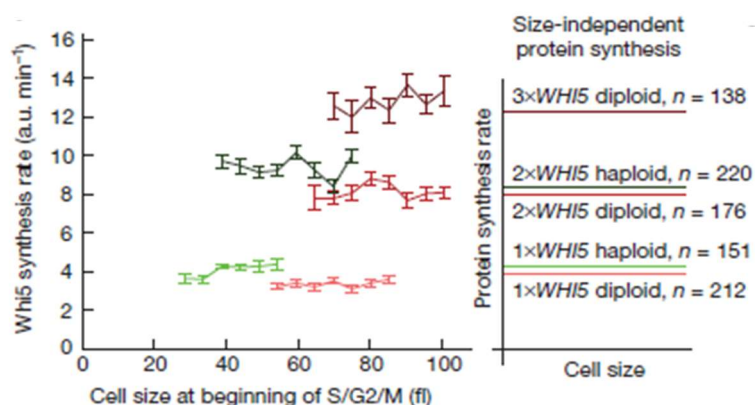


Figura 40: Dependencia de la dosis genética de *Whi5* en el tamaño celular y la ploidía

Experimento en que se pone de evidencia el efecto sobre el tamaño celular del nivel transcripcional de *WHI5* durante S/G₂/M. La duplicación del gen *Whi5* y su transcripción en células haploides promueven un incremento sostenido del tamaño celular en el siguiente ciclo celular. De igual forma se observa una reducción del tamaño en células diploides que les ha sido eliminado una de las dos copias del gen *WHI5*. Aunque esta variación del tamaño celular permite una aproximación al tamaño celular esperado para las células diploides no obtiene resultados iguales, por lo que si este sistema participara en la regulación del tamaño celular por ploidía debería ser participe parcial. Adaptado de [279].

ydj1 mad3 mostraron una gran tendencia a la diploidización, que no pudimos solventar con sistemas condicionales de expresión, y que ha impedido su estudio.

Por último, otro factor que se debe tener en cuenta con el incremento en ploidía es el cambio en el patrón de transcripción inducidos por la diploidización, que conlleva un cambio de las características morfológicas, fisiológicas y de desarrollo de las células [285].

En resumen, se considera que otros sistemas de regulación estarían interactuando con el mecanismo dependiente del número de centrómeros. Este efecto coordinado de diferentes mecanismos consolidaría un sistema muy estable y robusto de regulación del tamaño celular en función de la ploidía.

Degradación nuclear de Cln3 dependiente del centrómero

En este estudio se observa como la presencia un número más elevado de centrómeros conlleva a una reducción del nivel nuclear de Cln3 (Figura 28B), compatible con un mecanismo de degradación. Aunque actualmente no se conoce con total detalle la degradación de esta ciclina, está claramente relacionada con el sistema de degradación SCF, utilizando las proteínas *F-Box* Cdc4 y Grr1 en núcleo y citoplasma, respectivamente [82]. Por otra parte, un elemento clave de SCF es a la vez un componente del cinetocoro: Skp1, presente en el complejo CBF3 de la región CDEIII del centrómero [286]. Por este motivo se estudió la dependencia del tamaño celular del número de centrómeros en células deficientes en distintos componentes del complejo SCF, como son la proteína nuclear Cdc4, Cdc34 y Cdc53 (Figura 35). La pérdida de la dependencia del volumen celular al número de centrómeros en células carentes de Cdc4 o Cdc34 reforzó la idea de un sistema de degradación activado o localizado en el centrómero.

La presencia de Skp1 en el centrómero parece estar muy relacionada con su unión a Bub1 mediante un dominio GLEBS [277]. En este estudio se ha observado cómo la pérdida del dominio GLEBS en Mad3 conlleva a una pérdida de la dependencia del volumen celular a la dosis centromérica (Figura 36). Teniendo en cuenta que estudios previos sugieren mediante doble híbrido la interacción de Mad3 con Cln3 [278], en este trabajo se aportan evidencias de la interacción *in vivo* entre ambas proteínas (Figura 37), y esto ocurre de modo mucho más eficiente en presencia del dominio GLEBS, que también juega un papel importante en la interacción *in vivo* entre Mad3 y Cdc4 mostrada en el trabajo. Estos resultados sugieren que Skp1

mediaría las interacciones entre Cln3, Mad3 y Cdc4, y que dicho complejo (probablemente junto con Mad2) sería esencial en promover la degradación nuclear de Cln3 y establecer un tamaño celular en función del número de centrómeros. Así, se encontraría con mecanismos centroméricos similares de modulación de la degradación de ciclinas en mitosis o G₁, basados en APC o SCF, respectivamente, para estabilizar las ciclinas M por inhibición de Cdc20 [151], [287], o para estimular la degradación de ciclinas G₁ por un mecanismo todavía por desvelar.

Los CSPs pueden constituir un nuevo *checkpoint* de G₁

En la actualidad se desconoce qué actividad tienen diferentes componentes del cinetocoro antes de la transición G₁/S, donde ya están presentes, o si se trata de un evento únicamente preparatorio [146]–[149]. Los CSPs tienen un papel clave en el SAC [288], [289] en mitosis, y su presencia durante G₁ podría responder a un *checkpoint* desconocido de regulación para esta fase, que podría consistir en la degradación selectiva de Cln3 mediante la interacción con Mad3 (Figura 41). La superexpresión de Mad2 o Mad3 tiene efectos muy limitados sobre la progresión en G₁, al igual que con el SAC en mitosis, lo que sugiere que, como en el SAC, estos elementos estarían a nivel saturante y sería clave el sistema de activación o ensamblaje para su función en G₁. Ahora bien, mientras que es suficiente para activar el SAC [281], una fusión Mad2-Mad3 no produce un efecto claramente sinérgico en la progresión por G₁. Además no se observa una interconexión entre los elementos naturales de Mad3 que dirigen la respuesta durante su actividad en el SAC, como las cajas KEN que son esenciales para la unión e inhibición de Cdc20 [152]. Estos resultados, juntamente con las diferencias mostradas por Bub1 y Mad1, sugieren que los mecanismos que operan en G₁ y mitosis son fundamentalmente distintos.

¿Qué necesidad tiene la célula de regular esta etapa celular en función de la información procedente del centrómero? Varios estudios indican que la levadura promueve de forma regulada una segregación de los elementos del citoplasma y sus componentes durante la gemación, diferenciándolos entre la célula madre y la nueva célula hija. Esto permite a la nueva célula no recibir componentes dañados que se han acumulado durante ciclos anteriores, como por ejemplo los agregados proteicos procedentes de la acumulación de proteínas mal plegadas, para lo que existen mecanismos activos que los mantienen en la célula madre [290]. Vinculado a este fenómeno, estudios en segregación cromosómica hablan de la posibilidad de que la

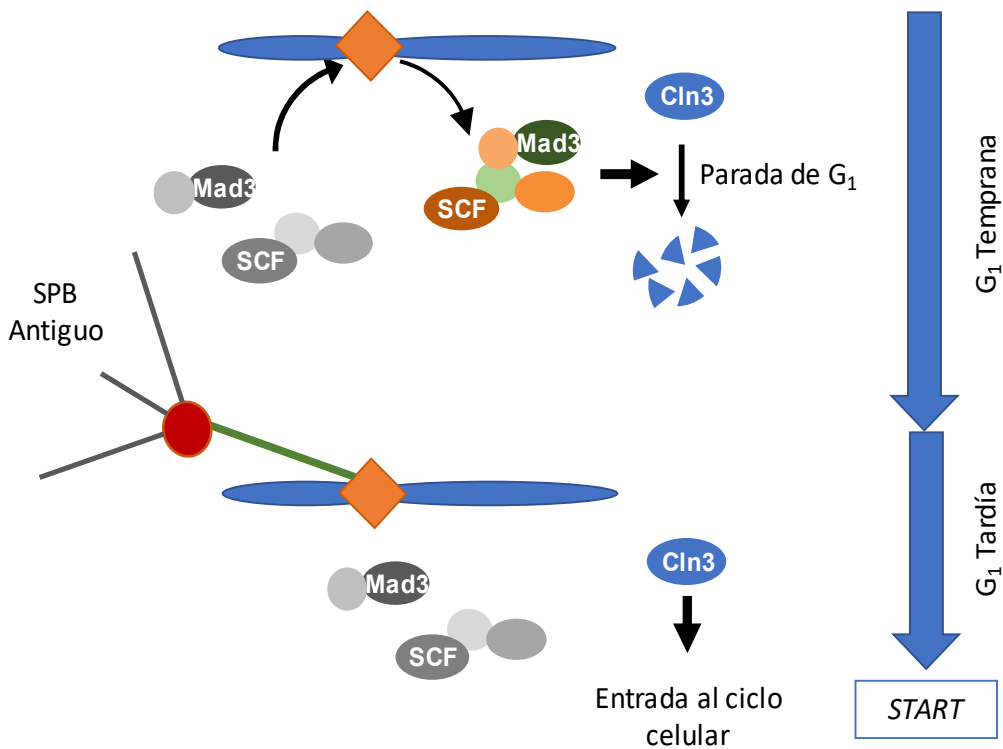


Figura 42: Nuevo *checkpoint* para la correcta actividad de los SPB durante G₁

Modelo hipotético simplificado para la regulación de la correcta segregación de los SPB en la célula durante G₁. Existen evidencias de que las hebras de DNA antiguas son segregadas hacia las células hijas seguramente mediante el establecimiento de conexiones tempranas durante G₁ con los SPBs antiguos, procedentes de la madre. El sistema de regulación que se propone para el incremento del tamaño celular dependiente de la dosis centromérica podría estar implicado en el establecimiento de un nuevo *checkpoint*, del que dependería la conexión a de SPBs antiguos. Mientras estos no existieran promoverían una parada del ciclo celular dependiente de la eliminación de Cln3, por los elementos del MCC y SCF reclutados en el centrómero. Actividad que cesaría al unirse los microtúbulos pertenecientes del SPB antiguo asegurando que las hebras correctas serán segregadas a la célula hija.

del MCC para inhibir la entrada en ciclo (Figura 42). Aunque experimentos preliminares con nocodazol han ofrecido resultados negativos, no se puede descartar que el posible *checkpoint* utilice otra información que la integridad de los microtúbulos u opere por mecanismos distintos al SAC.

Un nuevo modelo de regulación del tamaño celular por Mad3

En esta tesis se determina como Mad3 ha de ser un componente importante en la regulación del tamaño celular en levadura, especialmente para dotar de un sistema de comunicación entre el número centromérico, o el mismo centrómero, y la maquinaria de START permitiendo modular este incremento de tamaño (Figura 43).

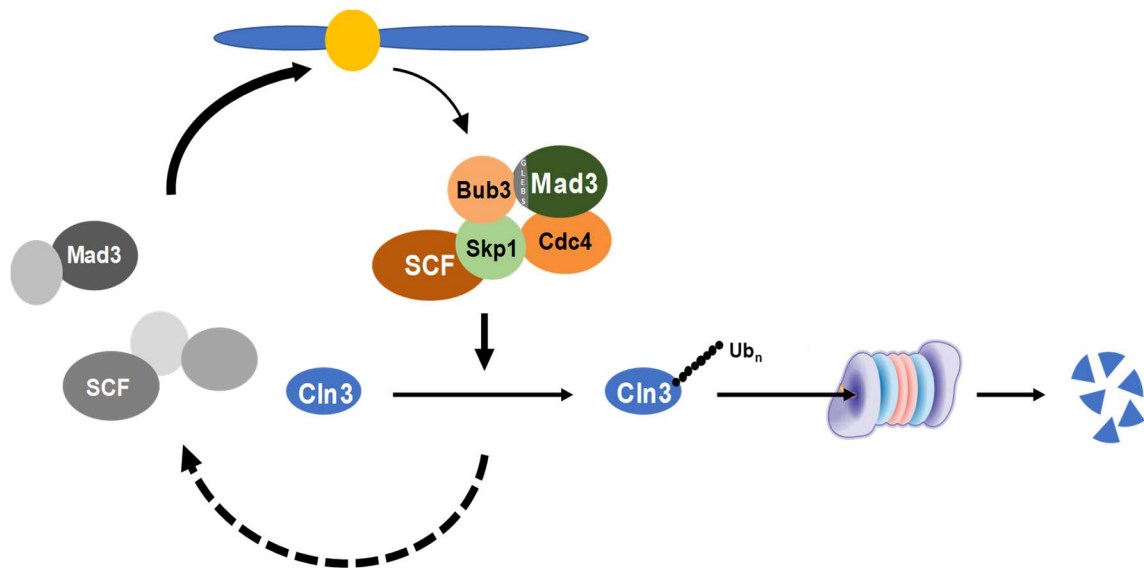


Figura 43: Modelo regulación del tamaño celular inducido por los centrómeros

Tras este estudio se propone un modelo molecular en el que los diferentes componentes del MCC, Bub3, Mad3 dependientes del motivo GLEBS y muy probablemente Mad2, podría reclutar los componentes del SCF presente en los centrómeros y Cdc4 para promover una mayor actividad de ubiquitinación sobre Cln3 y su degradación por el proteosoma. Tras esta actividad, los diferentes componentes serían reutilizados y participarían nuevamente en este ciclo, que sería dependiente del número de centrómero y su capacidad de reclutar los elementos necesarios.

En este punto se encuentran nuevas incógnitas a resolver que han surgido tras el estudio de este modelo. Como es, por ejemplo, el porqué de la saturabilidad de nuestro modelo. Podría existir un componente desconocido presente y dependiente del centrómero, que podría permitir una activación aún desconocida de Mad3, o que el mismo centrómero estuviera actuando como centro de nucleación de los diferentes componentes con una capacidad finita. Esta desconocida activación de Mad3 o de otro componente permitirá la unión a Mad2, Bub3 y Cln4 para responder al fenotipo final. Relacionado con este último aspecto, preguntar en qué lugar se unirían los diferentes componentes, que función tendrían en detectar Cln3 y permitir su degradación. Se formarían estos complejos teóricos en el cinetocoro o en el nucleoplasma, o podría ser un sistema de reclutamiento mixto, en el que parte de estas proteínas se ensamblarían para capturar a Cln3 en el nucleoplasma y este ser dirigido al cinetocoro donde esperarían los componentes del SCF para su degradación.

Todas estas y otras preguntas se abren alrededor del modelo permitiendo en un futuro continuar con esta línea de investigación y tratar nuevos puntos de este

DISCUSIÓN

mecanismo. Incluyendo un estudio de estos componentes y su fenotipo relacionado con el tamaño celular en células con una complejidad más elevada, ya que los principales componentes del modelo se presentan altamente conservados desde levadura hasta mamífero, están implicados en la regulación del ciclo celular [139], [140] y son importantes factores que participan en cáncer, como es el caso de BUBR1/Mad3 [296], [297], otro de los mayores retos de los científicos en la actualidad.

CONCLUSIONES

- Los YCps incrementan el volumen celular dependiendo de su número y correlacionando con el volumen celular de células diploides.
- El centrómero es el principal inductor de un mecanismo aun no descrito que modifica el comportamiento de las células durante el tránsito por la fase G₁.
- El número de centrómeros modula el volumen celular a través de Cln3, retrasando su acumulación nuclear durante G₁.
- Los elementos del MCC (Mad2, Mad3 y Bub3) son necesarios en la regulación del tamaño celular por ploidía, aunque no parecen ser suficientes.
- El mecanismo de actuación de las proteínas del MCC en G₁ comparte muchos elementos con el SAC en mitosis, pero es fundamentalmente distinto.
- Los elementos del SCF Cdc4 y Cdc34, están implicados en la regulación del tamaño celular dependiendo de la dosis centromérica.
- Mad3 interacciona *in vivo* con Cln3 y Cdc4. Estos elementos estarían modulando la degradación de Cln3 para regular el volumen celular en función de la ploidía.

TABLAS ADICIONALES

Tabla de anticuerpos utilizados en *western blot* y inmunoprecipiación

Anticuerpo Primario	Fuente	Condiciones	Anticuerpo Secundario	Fuente	Condiciones
12CA5 Monoclonal de Ratón (αHA)	<i>Roche</i>	2h a RT 1:500 en PBST al 0.25% Leche	NXA939 ECL α-Ratón IgG (Monoclonal oveja)	<i>GE</i> <i>healthcare</i>	1h a RT, 1:10.000 en PBST con 0.25% leche
ABN116 Policlonal de conejo (αGST)	<i>Millipore</i>	2h a RT 1:1000 en PBST al 0.25% Leche	10379664 ECL α-Conejo IgG (Monoclonal asno)	<i>Fisher</i>	1h a RT, 1:10.000 en PBST con 0.25% leche
9E10 Monoclonal de Ratón (αC-Myc)	<i>Sigma-</i> <i>Aldrich</i>	2h a RT 1:500 en PBST al 0.25% Leche	NXA939 ECL α-Ratón IgG (Monoclonal oveja)	<i>GE</i> <i>healthcare</i>	1h a RT, 1:10.000 en PBST con 0.25% leche
4BGE Glutathione Sepharose	<i>GE</i> <i>Healthcare</i>	Como se describe en: Análisis de interacción a pequeña escala de proteínas con marcaje GST			

Tabla de cepas utilizadas para este estudio

Nombre	Fondo Genético	Genotipo relevante
932-Y	CML128	<i>mad3::KANMX4</i>
1235-Y	CML128	<i>mad2::KANMX4</i>
1246-Y	IMX678	<i>Ch4-pGal-CEN4; Ch7-pGal-CEN4</i>
1251-Y	CML128 mCherry	<i>mad2::KANMX4</i>
1271-Y	CML128 mCherry	<i>mad3::KANMX4</i>
1321-Y	CML128	<i>leu2-3::LEU2, ura3-52::URA3, trp1::TRP1</i>
1410-Y	CML128	<i>whi5::KANMX4, mad2::NATNT2</i>
1412-Y	CML128 mCherry	<i>whi5::KANMX4</i>
1414-Y	CML128 mCherry	<i>cln3::HPHNT1</i>
1418-Y	CML128 mCherry	<i>bub3::KANMX4</i>
1420-Y	CML128 mCherry	<i>mad1::KANMX4</i>
1452-Y	CML128 mCherry	<i>cdc3-1-KANMX4</i>
1454-Y	W303-1A	<i>ura3-1::NATNT2-pTEF-mCherry</i>
1456-Y	CML128 mCherry	<i>bub1::KANMX4</i>
1462-Y	CML128	<i>mad3::KANMX4 whi5::LEU2MX5</i>
1538-Y	W303 <i>cdc4-1</i>	<i>ura3-1::NATNT2-pTEF-mCherry</i>
1540-Y	W303 <i>cdc34-1</i>	<i>ura3-1::NATNT2-pTEF-mCherry</i>
1542-Y	W303 <i>cdc53-1</i>	<i>ura3-1::NATNT2-pTEF-mCherry</i>
1550-Y	CML128	<i>MAD3-3HA-KANMX4</i>
1582-Y	1788	<i>mad3::KANMX4 / mad3::NATNT2</i>
1606-Y	CML128	<i>MAD3ΔGLEBS-3HA-KANMX4</i>
1608-Y	CML128	<i>MAD3ΔGLEBS-3HA-KANMX4 ura3.1::NATNT2-pTEF-mCherry</i>

Tabla de plásmidos utilizadas para este estudio

Nombre	Esqueleto	Modificación	Detalles de la construcción	Fuente
YCplac22			<i>Polylinker</i> de pUC19. Contiene <i>TRP1</i> , <i>ARS1</i> , <i>CEN4</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	[235]
YCplac33			<i>Polylinker</i> de pUC19. Contiene <i>URA3</i> , <i>ARS1</i> , <i>CEN4</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	[235]
YCplac111			<i>Polylinker</i> de pUC19. Contiene <i>LEU2</i> , <i>ARS1</i> , <i>CEN4</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	[235]
YEplac181			<i>Polylinker</i> de pUC18. Contiene <i>LEU2</i> , <i>2μm</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	[235]
YCpGAL	YCplac22		Vector de expresión bajo promotor <i>GALp</i> de <i>S. cerevisiae</i> . <i>CoIE1</i> , <i>ARS-CEN4</i>	[298]
pCYC180	YCplac33	<i>TEFp-CLN3-6FLAG</i> , <i>tTA</i>	Fragmento obtenido por restricción con PvuII desde el plásmido pCM87 fue insertado en el lugar <i>SpeI</i> incluyendo <i>tTA</i> del plasmidos pCM273.	[56]
339-P	pYAK-Amp	<i>TEFp-GFP</i>	214-P fue amplificado mediante <i>exsite</i> para añadir un terminador <i>CYC1</i> y amplificando el fragmento <i>TEFp-GFP</i> procedente de pYM-N21. Ambos amplicones fueron religados en un nuevo vector mediante recombinación <i>in vivo</i> en levadura.	Este estudio.
1010-P	YCpGal	<i>GALp-MAD2</i>	<i>MAD2</i> fue clonado mediante amplificación desde DNA genómico de CML128 y recombinado en el lugar <i>HindIII</i> .	Este estudio.
1012-P	YCpGal	<i>GALp-MAD3</i>	<i>MAD3</i> fue clonado mediante amplificación desde DNA genómico de CML128 y recombinado en el lugar <i>HindIII</i> .	Este estudio.

TABLAS ADICIONALES

1066-P	YCpGal	<i>GALp-MAD2-MAD3</i>	<i>MAD2</i> y <i>MAD3</i> fueron amplificados desde DNA genómico de CML128 incluyendo un <i>linker</i> entre ambos. Estos fueron amplificados unidos mediante una PCR de unión. Este último recombinado entre los sitios SptI y HindIII.	Este estudio.
1098-P	YCpGal	<i>GALp-MAD3-KEN30AAA</i>	1012-P fue amplificado para la mutación puntual de la caja KEN30 por AAA. Cerrado por recombinación y confirmado por secuenciación.	Este estudio.
1137-P	pROS10		Plásmido <i>CRIPR/CAS9, URA3, gRNA CAN.1Y + ADE2.Y</i>	<i>Euroscarf.</i>
1143-P	pROS17		Plásmido <i>CRIPR/CAS9, TRP1, gRNA CAN.1Y + ADE2.Y</i>	<i>Euroscarf.</i>
1168-P	pROS10	gRNA <i>Ch4 + Ch7</i>	Fragmentos gRNA <i>CAN.1Y</i> y gRNA <i>ADE2.Y</i> amplificados desde 1147-P fueron utilizados para intercambiar los gRNA <i>Ch4</i> y <i>Ch7</i> mediante amplificación. Estos dos insertos fueron recombinados con el vector 1137-P amplificado para ser abierto. Confirmado por secuenciación.	Este estudio.
1226-P	YCpLac22	<i>TEFp-GFP</i>	Inserto <i>TEFp-GFP</i> amplificado desde 339-P y recombinado entre HindIII y EcoRI.	Este estudio.
1228-P	YCpLac33	<i>TEFp-GFP</i>	Inserto <i>TEFp-GFP</i> amplificado desde 339-P y recombinado entre HindIII y EcoRI.	Este estudio.
1230-P	YCpLac111	<i>TEFp-GFP</i>	Inserto <i>TEFp-GFP</i> amplificado desde 339-P y recombinado entre HindIII y EcoRI.	Este estudio.
1341-P	YCpLac22	<i>TEFp-GFP GALp-CEN3</i>	1226-P fue amplificado para introducir entre la secuencia <i>ORI</i> y <i>AMP</i> los insertos <i>GALp</i> , amplificado desde YCpGal, y <i>CEN3</i> amplificado desde DNA genómico de CML128, mediante recombinación.	Este estudio.

1343-P	YCpLac33	<i>TEFp-GFP</i> <i>GALp-CEN3</i>	1228-P fue amplificado para introducir entre la secuencia ORI y AMP los insertos <i>GALp</i> , desde YCpGal, y <i>CEN3</i> desde DNA genómico de CML128, mediante recombinación.	Este estudio.
1344-P	YCpLac111	<i>TEFp-GFP</i> <i>GALp-CEN3</i>	1230-P fue amplificado para introducir entre <i>ORI</i> y <i>AMP</i> los insertos <i>GALp</i> , desde YCpGal, y <i>CEN3</i> desde DNA de CML128, mediante recombinación.	Este estudio.
1397-P	YCpGal	<i>GALp-MAD3-5A</i>	1012-P fue amplificado para la obtención de <i>MAD3</i> S15A, T275A, T438A, T457A y T479A y recombinado en YCpGal en sitio HindIII.	Este estudio.
1404-P	YEpLac181	<i>TEFp-GFP</i>	Inserto pTEF-GFP amplificado desde 339-P y recombinado entre HindIII y EcoRI.	Este estudio.
1624-P	pYES2-GST	<i>GALp-GST</i>		[82]
1625-P	pYES2-GST	<i>GST-NES-</i> <i>CDC4 ΔFBox-</i> <i>FLAG</i>	<i>NES-CDC4ΔFBox</i> fue amplificado desde el aa 323 hasta 780 e introducido entre los sitios de restricción BamHI y Sall.	[82]
1635-P	pYES2-GST	<i>GST-NES-</i> <i>MAD3-FLAG</i>	<i>MAD3</i> fue amplificado desde DNA genómico e insertado substituyendo mediante <i>exsite</i> <i>CDC4ΔFBox</i> en el plásmido 1625-P y recombinación <i>in vivo</i> en levadura.	Este estudio.
1637-P	pYES2-GST	<i>GST-NES-</i> <i>MAD3ΔGLEBS-</i> <i>FLAG</i>	<i>MAD3</i> (1-359aa) fue amplificado desde DNA genómico, eliminando la caja GLEBS e insertado en el plásmido 1625-P por recombinación	Este estudio
1652-P	pYES2-GST	<i>GST-CDC4</i>	<i>CDC4</i> fue amplificado desde DNA genómico e introducido en pYES-GST mediante recombinación <i>in vivo</i> en levadura entre los sitios de restricción BamHI y Sall.	Este estudio.

Tabla de oligonucleótidos utilizadas para *CRISPR/CAS9*

Nombre	Secuencia (5' -> 3')	Detalles de función
1412-O	GATCATTATCTTTCAC TGCG	Para amplificar pROS10 y prepararlo para la recombinación con los insertos con gRNA nuevos (<i>Fw</i> , <i>Rv</i>)
1413-O	CACCTTTCGAGAGGAC GATG	Para amplificar <i>template</i> izquierdo (gRNA CAN.1Y) sin secuencias de recombinación desde pROS17 (<i>Fw</i>)
1416-O	GCTGGCCTTTTGCTCA CATG	Para amplificar <i>template</i> derecho (gRNA ADE2.Y) sin secuencias de recombinación desde pROS17 (<i>Rev</i>)
1421-O	AACTTCTCCGCAGTG AAAGATAAATGATCatca tgaagaggacaaattaGTTTT AGAGCTAGAAATAGCA AG	Para introducir la secuencia <i>CRISPR</i> específica en gRNA para Cromosoma 4 entre <i>SAC7</i> y <i>UBA2</i> usando <i>template</i> izquierdo y aportar colas de recombinación con pROS10 (<i>Fw</i>)
1422-O	TCATTCCCCTTTCAAG ATTTATAACCATAAAG GGAACATATATAACAT AAAtgacgttaaagtatagagg	Para amplificar DNA de reparación con <i>GALp-CEN4</i> desde pYAC-AMP e recombinarlo en el lugar de restricción generado por la secuencia <i>CRISPR</i> en cromosoma 4 (<i>Fw</i>)
1423-O	TTTATTCTTTTATTTTAT ACTGATTAGCATCGCT ACAGAATAATTGTCCG gaactctaagaggtgatac	Para amplificar DNA de reparación con <i>GALp-CEN4</i> desde pYAC-AMP e recombinarlo en el lugar de restricción generado por la secuencia <i>CRISPR</i> en cromosoma 4 (<i>Rv</i>)
1424-O	AACTTCTCCGCAGTG AAAGATAAATGATCttcc actggctggaagcttgTTTT AGAGCTAGAAATAGCA AG	Para introducir la secuencia <i>CRISPR</i> específica en gRNA para Cromosoma 7 entre <i>MGA1</i> y <i>WHI8</i> usando <i>template</i> derecho y aportar colas de recombinación con pROS10 (<i>Rv</i>)
1425-O	ATTGCTCTTCTATGCA AGCACTTCACTCCTTT TCTTTCATCTCTGTTTT Cttgacgttaaagtatagagg	Para amplificar DNA de reparación con <i>GALp-CEN4</i> desde pYAC-AMP y recombinarlo en el lugar de restricción generado por la secuencia <i>CRISPR</i> en cromosoma 7 (<i>Fw</i>)
1426-O	GACGGAACAAGGCAAT GGTTGCAGGCGATAAA	Para amplificar DNA de reparación con <i>GALp-CEN4</i> desde pYAC-AMP e recombinarlo en el

	GAATCAAGAGGCAACC CTgaactctaagaggtgatac	lugar de restricción generado por la secuencia CRISPR en cromosoma 7 (<i>Rv</i>)
1427-O	TAACAAGCCGTTTCAGG CTC	Oligonucleótido para analizar la integración especifica de <i>GALp-CEN4</i> en cromosoma 4 (<i>Fw</i>)
1428-O	CAAGGATCCGCTTAAC ATTC	Oligonucleótido para analizar la integración especifica de <i>GALp-CEN4</i> en cromosoma 7(<i>Fw</i>)
1429-O	TGAAACGCAGATGTGC CTC	Para comprobar la integración de <i>GALp-CEN4</i> (<i>Rv</i>)
1545-O	GCGTTGATGATTCTTC ATTGG	Para amplificar <i>template</i> izquierdo (gRNA CAN.1Y) sin secuencias de recombinación desde pROS17 (<i>Rv</i>)
1547-O	ACAAAGTATGCGCAAT CCAC	Para amplificar <i>template</i> derecho (gRNA ADE2.Y) sin secuencias de recombinación desde pROS17 (<i>Fw</i>)
1546-O	gaacagaaagtgataGCGTT GATGATTCTTCATTGG	Para amplificar el inserto completo izquierdo con nuevo <i>CRISPR</i> y añadir cola de recombinación a pROS10 (<i>Rv</i>)
1548-O	tatcacttctgttcACAAAGTA TGCGCAATCCAC	Para amplificar el inserto completo derecho con nuevo <i>CRISPR</i> y añadir cola de recombinación a pROS10 (<i>Fw</i>)

Tabla de abreviaturas

Amp	Ampicilina	PBS	<i>Fosfat Buffer Saline</i>
APC/C	<i>Anaphase-Promoting Complex</i>	PBST	<i>Fosfat Buffer Saline with Tween-20</i>
ARS	<i>Autonomously Replicating Sequences</i>	PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
ATP	Adenosine triphosphate	PEG	Polietilenglicol
CDE	<i>Centromeric DNA Element</i>	PKA	Protein Kinase A
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>	PVDF	Poliviniliden Fluorur
C	Extracto celular	SAC	<i>Spindle assembly checkpoint</i>
CRP	Proteína reguladora centromérica	SBF	<i>Swi4 cell cycle Binding Factor</i>
Ctrl	Control	SCB	caja del ciclo celular Swi4
DAM1	<i>Duo1- And Mps1 (monopolar spindle 1)</i>	SCF	<i>Skp1-Cullin-F-box</i>
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol	SDC	Sintético Dextrosa Completo
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
E	Eluato	ssDNA	<i>Single-stranded DNA</i>
EDTA	<i>etilendiaminotetraacetic acid</i>	RE	Reticulo endoplasmático
Fw	<i>forward</i>	RNA	Ribonucleic acid
GAL	Galactosa	TA	Temperatura ambiente
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>	TAE	<i>Tris-acetate-EDTA Buffer</i>
GST	glutación S transferasas	TCA	<i>Tricloracetic acid</i>
H₂O MQ	Agua Milli-Q	TE	<i>Tris- EDTA Buffer</i>
KAN	Kanamicine	TEMED	Tetrametiletildiamina
LB	Luria Bertani	TOR	<i>Target of rapamicine</i>
MBF	<i>MluI cell cycle Box binding Factor</i>	u.r	Unidades relativas
MCB	<i>Mlu Cell cycle Box</i>	WB	<i>Western Blot</i>
MCC	<i>Mitotic checkpoint complex</i>	wt	<i>Wild tipe</i>
MEN	<i>Mitotic exit network</i>	YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
mRNA	Messenger ribonucleic acid	YPD	<i>Yeast peptone dextrose</i>
NAT	Nourseotricina	YPG	<i>Yeast peptone galactose</i>
NLS	<i>Nuclear localization sequence</i>		

RESUMEN

Resumen en español

Una de las características celulares con más impacto sobre su fisiología celular es el tamaño, regulada por multitud de factores extrínsecos e intrínsecos, y una característica de vital relevancia ya que afecta el volumen de diferentes orgánulos y su proporción, la arquitectura interna de la célula y tiene capacidad de adaptarse al contenido de DNA. Respecto a este último, y gracias a estudios que se remontan desde hace un siglo hasta la actualidad, se postula que existe un mecanismo por el cual la célula es capaz de regular su tamaño celular mediante ploidía. Esto ocurre a lo largo de todo el árbol de la vida, existiendo evidencias de una correlación lineal entre el tamaño y el número de cromosomas que contienen las células. No obstante, este mecanismo permanece esquivo y se desconoce que elementos participan.

Este estudio, basado en un modelo eucariota como es *S. cerevisiae*, se inició gracias a la observación previa que vectores lanzadera centroméricos, YCp, producen un incremento de tamaño. En este trabajo se ha determinado que el centrómero es el principal elemento inductor de este fenotipo, descartando otras opciones como la cantidad de DNA o la recuperación de vías metabólicas aportada por estos vectores, lo que se confirmó mediante cromosomas artificiales, YAK, y la integración de nuevos centrómeros condicionales en los cromosomas de levadura. Además, se ha desarrollado un sistema para cuantificar el número de centrómeros aportado a la célula mediante fluorescencia, protocolo que ha permitido relacionar de forma muy precisa la dosis centromérica al tamaño celular. Por lo que se refiere al mecanismo molecular implicado, se ha observado que un número elevado de centrómeros aumenta la degradación de la ciclina Cln3 a través de elementos del SCF presentes en el núcleo, lo que produce un claro retraso en la fase G₁ y, en consecuencia, un incremento en el tamaño celular. En este mecanismo se ha desvelado la participación de proteínas señalizadoras del centrómero, como son Mad3, Mad2, y Bub3, así como las interacciones *in vivo* entre Mad3 y Cln3 o Cdc4. Estos datos apuntan a la existencia de un nuevo mecanismo molecular para la regulación del tamaño celular por ploidía.

Resumen en inglés

As it plays a key role in cell behaviour and physiology, size is one of the most important characteristics of cells. Cell size is regulated by many different extrinsic and intrinsic factors, and it has an important relevance to regulate the proportion and volume of cell organelles, cell architecture and the capacity to adapt the cell to changes in DNA content. Regarding this last question and for more than a century many studies have tried to uncover the mechanisms that allow cells to regulate their size. This is a property common to the whole evolutionary scale and there are evidences of a linear correlation between chromosome number and cell size. However, the underlying mechanism is poorly understood and the key responsible molecules are unknown.

This study, based on *S. cerevisiae* as a eukaryotic model, started from a previous observation that centromeric shuttle vectors, YCp, produce an increase in cell size. We found that the centromere is the principal inductor of this phenotype, discarding other possible causes such as auxotrophic genes and amount of DNA, which was confirmed using yeast artificial chromosomes, YAK, and the integration of conditional centromeres on yeast chromosomes. In addition, a system to quantify the number of centromeres present at the single-cell level using fluorescence has been developed, which allowed to establish an extremely precise correlation between centromere number and cell size. Regarding the molecular mechanism involved, we have observed that an increased number of centromeres enhances Cln3 degradation by SCF components associated to centromeres in the nucleus, which cause a G₁ delay and, consequently, an increased cell size. In this mechanism, we have uncovered the participation of relevant centromeric signalling proteins: Mad2, Mad3, and Bub3, and the *in vivo* interaction between Mad3 and Cln3 or Cdc4. These data point to the existence of a novel molecular mechanism to regulate cell size as a function of ploidy.

BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] S. Forsburg and P. Nurse, "Cell Cycle Regulation in the Yeasts *Saccharomyces Cerevisiae* and *Schizosaccharomyces Pombe*," *Annu. Rev. Cell Biol.*, pp. 1–30, 1991.
- [2] D. Greig and J.-Y. Leu, "Natural history of budding yeast.," *Curr. Biol.*, vol. 19, no. 19, pp. R886-90, 2009.
- [3] R. K. Mortimer and J. R. Johnston, "Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center," *Genetics*, vol. 113, no. 1, pp. 35–43, 1986.
- [4] F. Foury, "Human genetic diseases: A cross-talk between man and yeast," *Gene*, vol. 195, no. 1, pp. 1–10, 1997.
- [5] D. Botstein and G. R. Fink, "Yeast: an experimental organism for modern biology.," *Science*, vol. 240, no. 4858, pp. 1439–43, 1988.
- [6] B. J. Brewer, E. Chlebowicz-Sledziowska, and W. L. Fangman, "Cell cycle phases in the unequal mother/daughter cell cycles of *Saccharomyces cerevisiae*.,," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 4, no. 11, pp. 2529–2531, 1984.
- [7] D. Botstein and G. R. Fink, "Yeast: An experimental organism for 21st century biology," *Genetics*, vol. 189, no. 3, pp. 695–704, 2011.
- [8] A. Goffeau *et al.*, "Life with 6000 Genes," *Science*, vol. 274, no. October, pp. 546–567, 1996.
- [9] S. G. Dann and G. Thomas, "The amino acid sensitive TOR pathway from yeast to mammals," *FEBS Lett.*, vol. 580, no. 12, pp. 2821–2829, 2006.
- [10] J. Ariño, "Integrative responses to high pH stress in *S. cerevisiae*.,," *OMICS*, vol. 14, no. 5, pp. 517–523, 2010.
- [11] E. de Nadal, P. M. Alepuz, and F. Posas, "Dealing with osmostress through MAP kinase activation," *EMBO Rep.*, vol. 3, no. 8, pp. 735–740, 2002.
- [12] S. Hohmann, M. Krantz, and B. Nordlander, "Yeast Osmoregulation," *Method. Enzymol.*, vol. 428, pp. 29–45, 2007.
- [13] S. Hohmann, "Osmotic adaptation in yeast-control of the yeast osmolyte system," *Int. Rev. Cytol.*, vol. 215, pp. 149–187, 2002.
- [14] W.-S. Wu and W.-H. Li, "Identifying gene regulatory modules of heat shock response in yeast.," *BMC Genomics*, vol. 9, p. 439, 2008.

- [15] J. Verghese, J. Abrams, Y. Wang, and K. A. Morano, "Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system.," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 76, no. 2, pp. 115–58, 2012.
- [16] H. G. Dohlman and J. E. Slessareva, "Pheromone signaling pathways in yeast.," *Sci. STKE*, vol. 2006, no. 364, p. cm6, 2006.
- [17] M. Aldea, "Control of Cell Cycle and Cell Growth by Molecular Chaperones," *Cell Cycle*, vol. 6, no. November, pp. 2599–2603, 2007.
- [18] F. Ferrezuelo *et al.*, "The critical size is set at a single-cell level by growth rate to attain homeostasis and adaptation.," *Nat. Commun.*, vol. 3, p. 1012, 2012.
- [19] G. C. Johnston, J. R. Pringle, and L. H. Hartwell, "Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Exp. Cell Res.*, vol. 105, no. 1, pp. 79–98, 1977.
- [20] L. H. Hartwell, "Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis," *Exp. Cell Res.*, vol. 69, no. 2, pp. 265–276, 1971.
- [21] P. D. Jeffrey *et al.*, "Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex.," *Nature*, vol. 376, no. 6538. pp. 313–320, 1995.
- [22] T. Evans, E. T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel, and T. Hunt, "Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division," *Cell*, vol. 33, no. 2, pp. 389–396, 1983.
- [23] H. Kobayashi, E. Stewart, R. Poon, J. P. Adamczewski, J. Gannon, and T. Hunt, "Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 3, no. November, pp. 1279–1294, 1992.
- [24] D. O. Morgan, *The cell cycle : principles of control*. New Science Press, 2007.
- [25] D. O. Morgan, "CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines, Clocks, and Microprocessors," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 13, no. 1, pp. 261–291, 1997.
- [26] L. H. Hartwell, "Three additional genes required for deoxyribonucleic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Bacteriol.*, vol. 115, no. 3, pp. 966–974, 1973.

- [27] D. Stuart and C. Wittenberg, "CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells," *Gene. Dev.*, vol. 9, no. 22, pp. 2780–2794, 1995.
- [28] B. Futcher, "Transcriptional regulatory networks and the yeast cell cycle," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 14, no. 6, pp. 676–683, 2002.
- [29] T. Moll, E. Schwob, C. Koch, A. Moore, H. Auer, and K. Nasmyth, "Transcription factors important for starting the cell cycle in yeast.," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 340, no. 1293, pp. 351–60, 1993.
- [30] E. Schwob and K. Nasmyth, "CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*," *Gene. Dev.*, vol. 7, no. 7 A, pp. 1160–1175, 1993.
- [31] C. Dahmann, J. F. X. Diffley, and K. A. Nasmyth, "S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state," *Curr. Biol.*, vol. 5, no. 11, pp. 1257–1269, 1995.
- [32] H. Richardson, D. J. Lew, M. Henze, K. Sugimoto, and S. I. Reed, "Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2," *Gene. Dev.*, vol. 6, no. 11, pp. 2021–2034, 1992.
- [33] D. Huang, H. Friesen, and B. Andrews, "Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast," *Mol. Microbiol.*, vol. 66, no. 2, pp. 303–314, 2007.
- [34] A. S. Carroll and E. K. O'Shea, "Pho85 and signaling environmental conditions," *Trends. Biochem. Sci.*, vol. 27, no. 2, pp. 87–93, 2002.
- [35] S. Menoyo *et al.*, "Phosphate-activated cyclin-dependent kinase stabilizes g1 cyclin to trigger cell cycle entry.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 33, no. 7, pp. 1273–1284, 2013.
- [36] A. W. Truman *et al.*, "CDK-Dependent Hsp70 phosphorylation controls G1 cyclin abundance and cell-cycle progression," *Cell*, vol. 151, no. 6, pp. 1308–1318, 2012.
- [37] S. Hernández-Ortega *et al.*, "Defective in mitotic arrest 1 (Dma1) ubiquitin ligase controls G 1 cyclin degradation," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 7, pp. 4704–4714, 2013.

- [38] R. Baserga, "Is cell size important?," *Cell Cycle*, vol. 6, no. 7. pp. 814–816, 2007.
- [39] M. Cook and M. Tyers, "Size control goes global," *Curr. Opin. Biotech.*, vol. 18, no. 4. pp. 341–350, 2007.
- [40] S. Cooper, "Control and maintenance of mammalian cell size.," *BMC Cell Biol.*, vol. 5, no. 1, p. 35, 2004.
- [41] W. D. Donachie and G. W. Blakely, "Coupling the initiation of chromosome replication to cell size in *Escherichia coli*," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 6, no. 2. pp. 146–150, 2003.
- [42] F. Grebien, H. Dolznig, H. Beug, and E. W. Mullner, "Cell size control: new evidence for a general mechanism.," *Cell Cycle*, vol. 4, no. 3, pp. 418–421, 2005.
- [43] J. Mitchison, "Growth during the cell cycle.," *Int Rev Cytol*, vol. 226, pp. 165–258, 2003.
- [44] A. Zaritsky, N. Vischer, and A. Rabinovitch, "Changes of initiation mass and cell dimensions by the 'eclipse,'" *Molecular Microbiology*, vol. 63, no. 1. pp. 15–21, 2007.
- [45] L. H. Hartwell and M. W. Unger, "Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division.," *J. Cell Biol.*, vol. 75, pp. 422–35, 1977.
- [46] R. K. Mortimer, "Radiobiological and genetic studies on a polyploid series (haploid to hexaploid) of *Saccharomyces cerevisiae*," *Radiat. Res.*, vol. 9, no. 3, pp. 312–326, 1958.
- [47] P. E. Sudbery, A. R. Goodey, and B. L. Carter, "Genes which control cell proliferation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Nature*, vol. 288, no. 5789, pp. 401–4, 1980.
- [48] F. R. Cross, "DAF1, a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 8, no. 11, pp. 4675–84, 1988.
- [49] R. Nash, G. Tokiwa, S. Anand, K. Erickson, and a B. Futcher, "The *WHI1+* gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog.," *EMBO J.*, vol. 7, no. 13, pp. 4335–46, 1988.

- [50] L. Dirick, T. Böhm, and K. Nasmyth, "Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*," *EMBO J.*, vol. 14, no. 19, pp. 4803–13, 1995.
- [51] M. D. Mendenhall and A. E. Hodge, "Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 62, no. 4, pp. 1191–243, 1998.
- [52] R. A. M. De Bruin, W. H. McDonald, T. I. Kalashnikova, J. Yates, and C. Wittenberg, "Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5," *Cell*, vol. 117, no. 7, pp. 887–898, 2004.
- [53] J. M. Skotheim, S. Di Talia, E. D. Siggia, and F. R. Cross, "Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry," *Nature*, vol. 454, no. 7202, pp. 291–6, 2008.
- [54] M. Tyers, G. Tokiwa, and B. Futcher, "Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins," *EMBO J.*, vol. 12, no. 5, pp. 1955–68, 1993.
- [55] R. S. Nash, T. Volpe, and B. Futcher, "Isolation and characterization of WHI3, a size-control gene of *saccharomyces cerevisiae*," *Genetics*, vol. 157, no. 4, pp. 1469–1480, 2001.
- [56] H. Wang, E. Garí, E. Vergés, C. Gallego, and M. Aldea, "Recruitment of Cdc28 by Whi3 restricts nuclear accumulation of the G1 cyclin-Cdk complex to late G1," *EMBO J.*, vol. 23, no. 1, pp. 180–90, 2004.
- [57] E. Vergés, N. Colomina, E. Garí, C. Gallego, and M. Aldea, "Cyclin Cln3 Is Retained at the ER and Released by the J Chaperone Ydj1 in Late G1 to Trigger Cell Cycle Entry," *Mol. Cell*, vol. 26, no. 5, pp. 649–662, 2007.
- [58] G. Yahya, E. Parisi, A. Flores, C. Gallego, and M. Aldea, "A Whi7-Anchored Loop Controls the G1 Cdk-Cyclin Complex at Start," *Mol. Cell*, vol. 53, no. 1, pp. 115–126, 2014.
- [59] R. J. Cho *et al.*, "A Genome-Wide Transcriptional Analysis of the Mitotic Cell Cycle," *Mol. Cell*, vol. 2, no. 1, pp. 65–73, 1998.
- [60] P. T. Spellman *et al.*, "Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization," *Mol Biol*

- Cell*, vol. 9, no. 12, pp. 3273–3297, 1998.
- [61] K. Nasmyth and L. Dirick, “The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast.,” *Cell*, vol. 66, no. 5, pp. 995–1013, 1991.
- [62] C. Koch, T. Moll, M. Neuberg, H. Ahorn, and K. Nasmyth, “A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase.,” *Science*, vol. 261, no. 5128, pp. 1551–7, 1993.
- [63] J. E. Slansky and P. J. Farnham, “Introduction to the E2F family: protein structure and gene regulation,” *Curr Top Microbiol Immunol*, vol. 208, pp. 1–30, 1996.
- [64] A. Hershko and A. Ciechanover, “The Ubiquitin System,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 67, no. 1, pp. 425–479, 1998.
- [65] R. J. Deshaies and C. A. Joazeiro, “RING domain E3 ubiquitin ligases,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 78, pp. 399–434, 2009.
- [66] A. Varshavsky, “The Ubiquitin System, an Immense Realm,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 81, no. 1, pp. 167–176, 2012.
- [67] P. Vandenabeele and M. J. M. Bertrand, “The role of the IAP E3 ubiquitin ligases in regulating pattern-recognition receptor signalling,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 12, pp. 833–844, 2012.
- [68] D. Finley, H. D. Ulrich, T. Sommer, and P. Kaiser, “The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*,” *Genetics*, vol. 192, no. 2, pp. 319–360, 2012.
- [69] R. J. Deshaies, “SCF and cullin/ring H2-based ubiquitin ligases,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, vol. 15, pp. 435–67, 1999.
- [70] D. M. Koepp, J. W. Harper, and S. J. Elledge, “How the cyclin became a cyclin: Regulated proteolysis in the cell cycle,” *Cell*, vol. 97, no. 4, pp. 431–434, 1999.
- [71] A. R. Willems, T. Goh, L. Taylor, I. Chernushevich, A. Shevchenko, and M. Tyers, “SCF ubiquitin protein ligases and phosphorylation-dependent proteolysis,” *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 354, no. 1389, pp. 1533–50, 1999.
- [72] C. Bai *et al.*, “SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box.,” *Cell*, vol. 86, no. 2, pp. 263–74,

- Jul. 1996.
- [73] D. Skowyra, K. L. Craig, M. Tyers, S. J. Elledge, and J. W. Harper, "F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex," *Cell*, vol. 91, no. 2, pp. 209–219, 1997.
- [74] N. Mathias *et al.*, "Cdc53p acts in concert with Cdc4p and Cdc34p to control the G1-to-S-phase transition and identifies a conserved family of proteins.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, no. 12, pp. 6634–6643, 1996.
- [75] A. R. Willems *et al.*, "Cdc53 targets phosphorylated G1 cyclins for degradation by the ubiquitin proteolytic pathway," *Cell*, vol. 86, no. 3, pp. 453–463, 1996.
- [76] E. Elizabeth Patton, A. R. Willems, and M. Tyers, "Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: Don't Skp the F-box hypothesis," *Trends. Genet.*, vol. 14, no. 6, pp. 236–243, 1998.
- [77] M. Goebel, J. Yochem, S. Jentsch, J. McGrath, A. Varshavsky, and B. Byers, "The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme," *Science*, vol. 241, no. 4871, pp. 1331–1335, 1988.
- [78] J. H. Seol *et al.*, "Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34," *Gene. Dev.*, vol. 13, no. 12, pp. 1614–1626, 1999.
- [79] T. Ohta, J. J. Michel, A. J. Schottelius, and Y. Xiong, "ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity," *Mol. Cell*, vol. 3, no. 4, pp. 535–541, 1999.
- [80] K. L. Craig and M. Tyers, "The F-box: A new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction," *Prog. Biophys. Mol. Bio.*, vol. 72, no. 3, pp. 299–328, 1999.
- [81] Y. Barral, S. Jentsch, and C. Mann, "G1 cyclin turnover and nutrient uptake are controlled by a common pathway in yeast," *Gene. Dev.*, vol. 9, no. 4, pp. 399–409, 1995.
- [82] B. D. Landry, J. P. Doyle, D. P. Toczyski, and J. A. Benanti, "F-box protein specificity for G1 cyclins is dictated by subcellular localization," *PLoS Genet.*, vol. 8, no. 7, 2012.
- [83] L. P. Jackson, S. I. Reed, and S. B. Haase, "Distinct mechanisms control the

- stability of the related S-phase cyclins Clb5 and Clb6.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 6, pp. 2456–66, 2006.
- [84] R. M. R. Feldman, C. C. Correll, K. B. Kaplan, and R. J. Deshaies, "A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p," *Cell*, vol. 91, no. 2, pp. 221–230, 1997.
- [85] S. Henchoz, Y. Chi, B. Catarin, I. Herskowitz, R. J. Deshaies, and M. Peter, "Phosphorylation- and ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor Far1p in budding yeast," *Gene. Dev.*, vol. 11, no. 22, pp. 3046–3060, 1997.
- [86] M. Blondel *et al.*, "Nuclear-specific degradation of Far1 is controlled by the localization of the F-box protein Cdc4.," *EMBO J.*, vol. 19, no. 22, pp. 6085–6097, 2000.
- [87] L. S. Drury, G. Perkins, and J. F. X. Diffley, "The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast," *EMBO J.*, vol. 16, no. 19, pp. 5966–5976, 1997.
- [88] M. Sánchez, A. Calzada, and A. Bueno, "The Cdc6 protein is ubiquitinated in vivo for proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 13, pp. 9092–9097, 1999.
- [89] P. Kaiser, R. A. L. Sia, E. G. S. Bardes, D. J. Lew, and S. I. Reed, "Cdc34 and the F-box protein Met30 are required for degradation of the Cdk-inhibitory kinase Swe1," *Gene. Dev.*, vol. 12, no. 16, pp. 2587–2597, 1998.
- [90] P. Nash *et al.*, "Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication.," *Nature*, vol. 414, no. 6863, pp. 514–521, 2001.
- [91] S. Irniger and K. Nasmyth, "The anaphase-promoting complex is required in G1 arrested yeast cells to inhibit B-type cyclin accumulation and to prevent uncontrolled entry into S-phase.," *J. Cell Sci.*, vol. 110 (Pt 1, pp. 1523–1531, 1997.
- [92] J. M. Peters, "The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 7, no. 9, pp. 644–656, 2006.
- [93] M. Sullivan and D. O. Morgan, "Finishing mitosis, one step at a time.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 11, pp. 894–903, 2007.

- [94] O. Cohen-Fix, J. M. Peters, M. W. Kirschner, and D. Koshland, "Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p," *Gene Dev.*, vol. 10, no. 24, pp. 3081–3093, 1996.
- [95] Y. L. Juang, J. Huang, J. M. Peters, M. E. McLaughlin, C. Y. Tai, and D. Pellman, "APC-mediated proteolysis of Ase1 and the morphogenesis of the mitotic spindle," *Science*, vol. 275, no. 5304, pp. 1311–1314, 1997.
- [96] M. Shirayama, W. Zachariae, R. Ciosk, and K. Nasmyth, "The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in *Saccharomyces cerevisiae*," *EMBO J.*, vol. 17, no. 5, pp. 1336–1349, 1998.
- [97] D. M. Gordon and D. M. Roof, "Degradation of the kinesin Kip1p at anaphase onset is mediated by the anaphase-promoting complex and Cdc20p," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 22, pp. 12515–20, 2001.
- [98] D. Barford, "Structure, function and mechanism of the anaphase promoting complex (APC/C)," *Q. Rev. Biophys.*, vol. 44, no. 2, pp. 153–190, May 2011.
- [99] R. Visintin, S. Prinz, and A. Amon, "CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis," *Science*, vol. 278, no. 5337, pp. 460–463, 1997.
- [100] S. Prinz, E. S. Hwang, R. Visintin, and A. Amon, "The regulation of Cdc20 proteolysis reveals a role for the APC components Cdc23 and Cdc27 during S phase and early mitosis," *Curr. Biol.*, vol. 8, no. 13, pp. 750–760, 1998.
- [101] J. A. Pesin and T. L. Orr-Weaver, "Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 24, pp. 475–99, 2008.
- [102] A. D. Rudner and A. W. Murray, "Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex," *J. Cell Biol.*, vol. 149, no. 7, pp. 1377–1390, 2000.
- [103] W. Zachariae and K. Nasmyth, "Whose end is destruction: Cell division and the anaphase-promoting complex," *Gene Dev.*, vol. 13, no. 16, pp. 2039–2058, 1999.
- [104] S. L. Jaspersen, J. F. Charles, and D. O. Morgan, "Inhibitory phosphorylation of

the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14," *Curr. Biol.*, vol. 9, no. 5, pp. 227–236, 1999.

- [105] L. Clarke and J. Carbon, "Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes.," *Nature*, vol. 287, no. 5782, pp. 504–509, 1980.
- [106] L. Clarke and J. Carbon, "Genomic substitutions of centromeres in *Saccharomyces cerevisiae*," *Nature*, vol. 305, no. 5929, pp. 23–28, Sep. 1983.
- [107] P. Hieter, D. Pridmore, J. H. Hegemann, M. Thomas, R. W. Davis, and P. Philippsen, "Functional selection and analysis of yeast centromeric DNA," *Cell*, vol. 42, no. 3, pp. 913–921, 1985.
- [108] M. Fitzgerald-Hayes, L. Clarke, and J. Carbon, "Nucleotide sequence comparisons and functional analysis of yeast centromere DNAs," *Cell*, vol. 29, no. 1, pp. 235–244, 1982.
- [109] J. McGrew, B. Diehl, and M. Fitzgerald-Hayes, "Single base-pair mutations in centromere element III cause aberrant chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 6, no. 2, pp. 530–8, 1986.
- [110] P. A. Wigge and J. V. Kilmartin, "The Ndc80p complex from *Saccharomyces cerevisiae* contains conserved centromere components and has a function in chromosome segregation," *J. Cell Biol.*, vol. 152, no. 2, pp. 349–360, 2001.
- [111] I. M. Cheeseman *et al.*, "Implication of a novel multiprotein Dam1p complex in outer kinetochore function," *J. Cell Biol.*, vol. 155, no. 7, pp. 1137–1145, 2001.
- [112] T. U. Tanaka *et al.*, "Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora Kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections," *Cell*, vol. 108, no. 3, pp. 317–329, 2002.
- [113] S. Buvelot, S. Y. Tatsutani, D. Vermaak, and S. Biggins, "The budding yeast Ipl1/Aurora protein kinase regulates mitotic spindle disassembly," *J. Cell Biol.*, vol. 160, no. 3, pp. 329–339, 2003.
- [114] S. Biggins, F. F. Severin, N. Bhalla, I. Sassoon, A. A. Hyman, and A. W. Murray, "The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast," *Gene. Dev.*, vol. 13, no. 5, pp. 532–544, 1999.
- [115] I. M. Cheeseman *et al.*, "Phospho-regulation of kinetochore-microtubule

- attachments by the Aurora kinase Ipl1p,” *Cell*, vol. 111, no. 2. pp. 163–172, 2002.
- [116] C. Shang *et al.*, “Kinetochore protein interactions and their regulation by the Aurora kinase Ipl1p,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 14, no. 8, pp. 3342–55, 2003.
- [117] B. A. Pinsky, S. Y. Tatsutani, K. A. Collins, and S. Biggins, “An Mtw1 complex promotes kinetochore biorientation that is monitored by the Ipl1/Aurora protein kinase,” *Dev. Cell*, vol. 5, no. 5, pp. 735–745, 2003.
- [118] Y. Yamagishi, C.-H. Yang, Y. Tanno, and Y. Watanabe, “MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 14, no. 7, pp. 746–752, 2012.
- [119] L. Mariani *et al.*, “Role of the Mad2 dimerization interface in the spindle assembly checkpoint independent of kinetochores,” *Curr. Biol.*, vol. 22, no. 20, pp. 1900–1908, 2012.
- [120] L. A. Shepperd *et al.*, “Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint,” *Curr. Biol.*, vol. 22, no. 10, pp. 891–9, May 2012.
- [121] N. London, S. Ceto, J. A. Ranish, and S. Biggins, “Phosphoregulation of Spc105 by Mps1 and PP1 regulates Bub1 localization to kinetochores,” *Curr. Biol.*, vol. 22, no. 10, pp. 900–906, 2012.
- [122] T. Kiyomitsu, C. Obuse, and M. Yanagida, “Human Blinkin/AF15q14 Is Required for Chromosome Alignment and the Mitotic Checkpoint through Direct Interaction with Bub1 and BubR1,” *Dev. Cell*, vol. 13, no. 5, pp. 663–676, 2007.
- [123] K. M. Godek, L. Kabeche, and D. A. Compton, “Regulation of kinetochore-microtubule attachments through homeostatic control during mitosis,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 16, no. 1, pp. 57–64, 2015.
- [124] F. Lampert and S. Westermann, “A blueprint for kinetochores - new insights into the molecular mechanics of cell division,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 12, pp. 407–412, 2011.
- [125] A. P. Joglekar, K. S. Bloom, and E. D. Salmon, “Mechanisms of force generation by end-on kinetochore-microtubule attachments,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 22, no. 1. pp. 57–67, 2010.
- [126] M. J. Cai and R. W. Davis, “Purification of a yeast centromere-binding protein

that is able to distinguish single base-pair mutations in its recognition site.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 2544–50, 1989.

- [127] R. E. Baker and D. C. Masison, "Isolation of the gene encoding the *Saccharomyces cerevisiae* centromere-binding protein CP1," *Mol Cell Biol*, vol. 10, no. 6, pp. 2458–2467, 1990.
- [128] M. Cai and R. W. Davis, "Yeast centromere binding protein CBF1, of the helix-loop-helix protein family, is required for chromosome stability and methionine prototrophy," *Cell*, vol. 61, no. 3, pp. 437–446, 1990.
- [129] B. Jehn, R. Niedenthal, and J. H. Hegemann, "In vivo analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* centromere CDEIII sequence: requirements for mitotic chromosome segregation.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 11, no. 10, pp. 5212–21, 1991.
- [130] J. Lechner and J. Carbon, "A 240 kd multisubunit protein complex, CBF3, is a major component of the budding yeast centromere.," *Cell*, vol. 64, no. 4, pp. 717–725, 1991.
- [131] K. A. Collins, R. Camahort, C. Seidel, J. L. Gerton, and S. Biggins, "The overexpression of a *Saccharomyces cerevisiae* centromeric histone H3 variant mutant protein leads to a defect in kinetochore biorientation," *Genetics*, vol. 175, no. 2, pp. 513–525, 2007.
- [132] W. C. Au, M. J. Crisp, S. Z. DeLuca, O. J. Rando, and M. A. Basrai, "Altered dosage and mislocalization of histone H3 and Cse4p lead to chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae*," *Genetics*, vol. 179, no. 1, pp. 263–275, 2008.
- [133] A. Amon, "The spindle checkpoint.," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 9, no. 1, pp. 69–75, Feb. 1999.
- [134] K. Nasmyth, "Segregating Sister Genomes: The Molecular Biology of Chromosome Separation," *Science*, vol. 297, no. 5581, pp. 559–565, Jul. 2002.
- [135] D. J. Lew and D. J. Burke, "The Spindle Assembly and Spindle Position Checkpoints," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 37, no. 1, pp. 251–282, Dec. 2003.
- [136] E. S. Gillett, C. W. Espelin, and P. K. Sorger, "Spindle checkpoint proteins and chromosome-microtubule attachment in budding yeast.," *J. Cell Biol.*, vol. 164, no. 4, pp. 535–46, Feb. 2004.

- [137] M. a Hoyt, L. Totis, and B. T. Roberts, "S. cerevisiae genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function.," *Cell*, vol. 66, pp. 507–517, 1991.
- [138] R. Li and A. W. Murray, "Feedback control of mitosis in budding yeast," *Cell*, vol. 66, no. 3, pp. 519–531, 1991.
- [139] A. Musacchio and K. G. Hardwick, "The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 10, pp. 731–741, 2002.
- [140] S. S. Taylor, M. I. F. Scott, and A. J. Holland, "The spindle checkpoint: A quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation," *Chromosom. Res.*, vol. 12, no. 6, pp. 599–616, 2004.
- [141] L. H. Hwang *et al.*, "Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint.," *Science*, vol. 279, no. 5353, pp. 1041–4, 1998.
- [142] R. D. Gardner, A. Poddar, C. Yellman, P. A. Tavormina, M. C. Monteagudo, and D. J. Burke, "The spindle checkpoint of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* requires kinetochore function and maps to the CBF3 domain," *Genetics*, vol. 157, no. 4, pp. 1493–1502, 2001.
- [143] M. L. McClelland *et al.*, "The highly conserved Ndc80 complex is required for kinetochore assembly, chromosome congression, and spindle checkpoint activity," *Gene. Dev.*, vol. 17, no. 1, pp. 101–114, 2003.
- [144] B. M. Stern and A. W. Murray, "Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast," *Curr. Biol.*, vol. 11, no. 18, pp. 1462–1467, 2001.
- [145] C. L. Rieder, R. W. Cole, A. Khodjakov, and G. Sluder, "The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores," *J. Cell Biol.*, vol. 130, no. 4, pp. 941–948, 1995.
- [146] V. Sudakin, G. K. T. Chan, and T. J. Yen, "Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2," *J. Cell Biol.*, vol. 154, no. 5, pp. 925–936, 2001.
- [147] R. Fraschini, A. Beretta, L. Sironi, A. Musacchio, G. Lucchini, and S. Piatti, "Bub3

- interaction with Mad2, Mad3 and Cdc20 is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores,” *EMBO J.*, vol. 20, no. 23, pp. 6648–6659, 2001.
- [148] E. M. Kim and D. J. Burke, “DNA damage activates the SAC in an ATM/ATR-dependent manner, independently of the kinetochore.,” *PLoS Genet.*, vol. 4, no. 2, 2008.
- [149] L. A. Malureanu, K. B. Jeganathan, M. Hamada, L. Wasilewski, J. Davenport, and J. M. van Deursen, “BubR1 N Terminus Acts as a Soluble Inhibitor of Cyclin B Degradation by APC/CCdc20 in Interphase,” *Dev. Cell*, vol. 16, no. 1, pp. 118–131, 2009.
- [150] W. C. H. Chao, K. Kulkarni, Z. Zhang, E. H. Kong, and D. Barford, “Structure of the mitotic checkpoint complex,” *Nature*, vol. 484, no. 7393, pp. 208–213, 2012.
- [151] J. L. Burton and M. J. Solomon, “Mad3p, a pseudosubstrate inhibitor of APC/Cdc20 in the spindle assembly checkpoint.,” *Gene. Dev.*, vol. 21, no. 6, pp. 655–67, Mar. 2007.
- [152] E. M. J. King, S. J. A. van der Sar, and K. G. Hardwick, “Mad3 KEN boxes mediate both Cdc20 and Mad3 turnover, and are critical for the spindle checkpoint,” *PLoS One*, vol. 2, no. 4, 2007.
- [153] D. Izawa and J. Pines, “The mitotic checkpoint complex binds a second CDC20 to inhibit active APC/C.,” *Nature*, vol. 517, no. 7536, pp. 631–634, 2014.
- [154] V. Rossio *et al.*, “The RSC chromatin-remodeling complex influences mitotic exit and adaptation to the spindle assembly checkpoint by controlling the Cdc14 phosphatase.,” *J. Cell Biol.*, vol. 191, no. 5, pp. 981–97, Nov. 2010.
- [155] I. T. Foe, S. A. Foster, S. K. Cheung, S. Z. Deluca, D. O. Morgan, and D. P. Toczyski, “Ubiquitination of Cdc20 by the APC occurs through an intramolecular mechanism,” *Curr. Biol.*, vol. 21, no. 22, pp. 1870–1877, 2011.
- [156] S. A. Foster and D. O. Morgan, “The APC/C Subunit Mnd2/Apc15 Promotes Cdc20 Autoubiquitination and Spindle Assembly Checkpoint Inactivation,” *Mol. Cell*, vol. 47, no. 6, pp. 921–932, 2012.
- [157] J. Pan and R. H. Chen, “Spindle checkpoint regulates Cdc20p stability in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Gene. Dev.*, vol. 18, no. 12, pp. 1439–1451, 2004.
- [158] P. Lara-Gonzalez, M. I. F. Scott, M. Diez, O. Sen, and S. S. Taylor, “BubR1

- blocks substrate recruitment to the APC/C in a KEN-box-dependent manner,” *J. Cell Sci.*, vol. 124, no. 24, pp. 4332–4345, 2011.
- [159] K. Overlack *et al.*, “A molecular basis for the differential roles of Bub1 and BubR1 in the spindle assembly checkpoint.,” *Elife*, vol. 4, pp. 1–24, 2015.
- [160] I. Primorac *et al.*, “Bub3 reads phosphorylated MELT repeats to promote spindle assembly checkpoint signaling,” *Elife*, vol. 2013, no. 2, pp. 1–20, 2013.
- [161] S. S. Taylor, E. Ha, and F. McKeon, “The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase,” *J. Cell Biol.*, vol. 142, no. 1, pp. 1–11, 1998.
- [162] N. a Larsen, J. Al-Bassam, R. R. Wei, and S. C. Harrison, “Structural analysis of Bub3 interactions in the mitotic spindle checkpoint.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 4, pp. 1201–1206, 2007.
- [163] A. De Antoni *et al.*, “The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint,” *Curr. Biol.*, vol. 15, no. 3, pp. 214–225, 2005.
- [164] M. Mapelli, L. Massimiliano, S. Santaguida, and A. Musacchio, “The Mad2 Conformational Dimer: Structure and Implications for the Spindle Assembly Checkpoint,” *Cell*, vol. 131, no. 4, pp. 730–743, 2007.
- [165] E. M. J. King, N. Rachidi, N. Morrice, K. G. Hardwick, and M. J. R. Stark, “Ipl1p-dependent phosphorylation of Mad3p is required for the spindle checkpoint response to lack of tension at kinetochores,” *Gene. Dev.*, vol. 21, no. 10, pp. 1163–1168, 2007.
- [166] J. Zich *et al.*, “Kinase activity of fission yeast Mph1 is required for Mad2 and Mad3 to stably bind the anaphase promoting complex.,” *Curr. Biol.*, vol. 22, no. 4, pp. 296–301, Feb. 2012.
- [167] Z. Tang, H. Shu, D. Oncel, S. Chen, and H. Yu, “Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint,” *Mol. Cell*, vol. 16, no. 3, pp. 387–397, 2004.
- [168] J. Maciejowski, K. A. George, M. E. Terret, C. Zhang, K. M. Shokat, and P. V. Jallepalli, “Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint

- signaling,” *J. Cell Biol.*, vol. 190, no. 1, pp. 89–100, 2010.
- [169] L. Hewitt *et al.*, “Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex,” *J. Cell Biol.*, vol. 190, no. 1, pp. 25–34, 2010.
- [170] N. Kwiatkowski *et al.*, “Small-molecule kinase inhibitors provide insight into Mps1 cell cycle function,” *Nat Chem Biol*, vol. 6, no. 5, pp. 359–368, 2010.
- [171] S. Santaguida, A. Tighe, A. M. D’Alise, S. S. Taylor, and A. Musacchio, “Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine,” *J. Cell Biol.*, vol. 190, no. 1, pp. 73–87, 2010.
- [172] I. M. Cheeseman *et al.*, “A conserved protein network controls assembly of the outer kinetochore and its ability to sustain tension,” *Gene. Dev.*, vol. 18, no. 18, pp. 2255–2268, 2004.
- [173] P. E. Rischitor, K. M. May, and K. G. Hardwick, “Bub1 is a fission yeast kinetochore scaffold protein, and is sufficient to recruit other spindle checkpoint proteins to ectopic sites on chromosomes,” *PLoS One*, vol. 2, no. 12, 2007.
- [174] V. Vanoosthuysse, R. Valsdottir, J.-P. Javerzat, and K. G. Hardwick, “Kinetochore targeting of fission yeast Mad and Bub proteins is essential for spindle checkpoint function but not for all chromosome segregation roles of Bub1p.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 22, pp. 9786–9801, 2004.
- [175] D. W. Thompson, *On growth and form*, vol. 375. 1961.
- [176] J. J. Turner, J. C. Ewald, and J. M. Skotheim, “Cell size control in yeast,” *Curr. Biol.*, vol. 22, no. 9, pp. R350–R359, 2012.
- [177] Y.-H. M. Chan and W. F. Marshall, “Scaling properties of cell and organelle size.,” *Organogenesis*, vol. 6, no. 2, pp. 88–96, 2010.
- [178] T. R. Gregory, “Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma.,” *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, vol. 76, no. 1, pp. 65–101, 2001.
- [179] A. Sveiczer, B. Novak, and J. M. Mitchison, “The size control of fission yeast revisited,” *J. Cell Sci.*, vol. 2957, pp. 2947–2957, 1996.

- [180] S. Di Talia, J. M. Skotheim, J. M. Bean, E. D. Siggia, F. R. Cross, and S. Di Talia, "The effects of molecular noise and size control on variability in the budding yeast cell cycle.," *Nature*, vol. 448, no. 7156, pp. 947–51, 2007.
- [181] P. Nurse and P. Thuriaux, "Controls over the timing of DNA replication during the cell cycle of fission yeast," *Exp. Cell Res.*, vol. 107, no. 2, pp. 365–375, 1977.
- [182] H. Dolznig, F. Grebien, T. Sauer, H. Beug, and E. W. Müllner, "Evidence for a size-sensing mechanism in animal cells.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 6, no. 9, pp. 899–905, 2004.
- [183] A. Tzur, R. Kafri, V. S. LeBleu, G. Lahav, and M. W. Kirschner, "Cell growth and size homeostasis in proliferating animal cells.," *Science*, vol. 325, no. 5937, pp. 167–71, 2009.
- [184] S. Son *et al.*, "Direct observation of mammalian cell growth and size regulation," *Nat. Methods*, vol. 9, no. 9, pp. 910–912, 2012.
- [185] G. C. Johnston, C. W. Ehrhardt, A. Lorincz, and B. L. Carter, "Regulation of cell size in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Bacteriol.*, vol. 137, no. 1, pp. 1–5, 1979.
- [186] P. G. Lord and A. E. Wheals, "Rate of cell cycle initiation of yeast cells when cell size is not a rate-determining factor.," *J. Cell Sci.*, vol. 59, no. 1, pp. 183–201, 1983.
- [187] A. Colman-Lerner, T. E. Chin, and R. Brent, "Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates," *Cell*, vol. 107, no. 6, pp. 739–750, 2001.
- [188] E. L. Weiss, C. Kurischko, C. Zhang, K. Shokat, D. G. Drubin, and F. C. Luca, "The *Saccharomyces cerevisiae* Mob2p-Cbk1p kinase complex promotes polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate daughter cell-specific localization of Ace2p transcription factor," *J. Cell Biol.*, vol. 158, no. 5, pp. 885–900, 2002.
- [189] M. P. Cosma, "Daughter-specific repression of *Saccharomyces cerevisiae* HO: Ash1 is the commander.," *EMBO Rep.*, vol. 5, no. 10, pp. 953–957, 2004.
- [190] S. Di Talia, H. Wang, J. M. Skotheim, A. P. Rosebrock, B. Futcher, and F. R. Cross, "Daughter-specific transcription factors regulate cell size control in

- budding yeast,” *PLoS Biol.*, vol. 7, no. 10, 2009.
- [191] T. L. Laabs, D. D. Markwardt, M. G. Slattery, L. L. Newcomb, D. J. Stillman, and W. Heideman, “ACE2 is required for daughter cell-specific G1 delay in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 18, pp. 10275–10280, 2003.
- [192] K. M. Schmoller, J. J. Turner, M. Kõivomägi, and J. M. Skotheim, “Dilution of the cell cycle inhibitor Whi5 controls budding-yeast cell size,” *Nature*, vol. 526, no. 7572, pp. 268–72, 2015.
- [193] B. Futcher, “Cyclins and the wiring of the yeast cell cycle,” *Yeast*, vol. 12, no. 16, pp. 1635–46, Dec. 1996.
- [194] H. Wijnen, A. Landman, and B. Futcher, “The G(1) cyclin Cln3 promotes cell cycle entry via the transcription factor Swi6,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 22, no. 12, pp. 4402–18, 2002.
- [195] G. Charvin, C. Oikonomou, E. D. Siggia, and F. R. Cross, “Origin of irreversibility of cell cycle start in budding yeast,” *PLoS Biol.*, vol. 8, no. 1, 2010.
- [196] B. Shilo, V. G. H. Riddle, and A. B. Pardee, “Protein turnover and cell-cycle initiation in yeast,” *Exp. Cell Res.*, vol. 123, no. 2, pp. 221–227, 1979.
- [197] M. Tyers, G. Tokiwa, R. Nash, and B. Futcher, “The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation,” *EMBO J.*, vol. 11, no. 5, pp. 1773–84, 1992.
- [198] H. Wang, L. B. Carey, Y. Cai, H. Wijnen, and B. Futcher, “Recruitment of Cln3 cyclin to promoters controls cell cycle entry via histone deacetylase and other targets,” *PLoS Biol.*, vol. 7, no. 9, 2009.
- [199] L. Shi and B. P. Tu, “Acetyl-CoA induces transcription of the key G1 cyclin CLN3 to promote entry into the cell division cycle in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 18, pp. 7318–7323, 2013.
- [200] M. Polymenis and E. V. Schmidt, “Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast,” *Gene. Dev.*, vol. 11, no. 19, pp. 2522–2531, 1997.
- [201] C. J. Di Como, H. Chang, and K. T. Arndt, “Activation of CLN1 and CLN2 G1 cyclin gene expression by BCK2,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 15, no. 4, pp. 1835–1846,

- 1995.
- [202] A. Manukyan *et al.*, “Ccr4 alters cell size in yeast by modulating the timing of CLN1 and CLN2 expression,” *Genetics*, vol. 179, no. 1, pp. 345–357, 2008.
- [203] L. Popolo, M. Vanoni, and L. Alberghina, “Control of the yeast cell cycle by protein synthesis,” *Exp. Cell Res.*, vol. 142, no. 1, pp. 69–78, 1982.
- [204] S. A. Moore, “Kinetic evidence for a critical rate of protein synthesis in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell cycle,” *J Biol Chem*, vol. 263, pp. 9674–9681, 1988.
- [205] F. Moretto, I. Sagot, B. Daignan-Fornier, and B. Pinson, “A pharmaco-epistasis strategy reveals a new cell size controlling pathway in yeast.,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 9, no. 707, p. 707, 2013.
- [206] K. A. Bernstein, F. Bleichert, J. M. Bean, F. R. Cross, and S. J. Baserga, “Ribosome biogenesis is sensed at the Start cell cycle checkpoint.,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 18, no. 3, pp. 953–64, 2007.
- [207] N. C. Barbet, U. Schneider, S. B. Helliwell, I. Stansfield, M. F. Tuite, and M. N. Hall, “TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast.,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 7, no. 1, pp. 25–42, 1996.
- [208] B. Smets *et al.*, “Life in the midst of scarcity: Adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Curr. Genet.*, vol. 56, no. 1. pp. 1–32, 2010.
- [209] P. Jorgensen, J. L. Nishikawa, B.-J. Breikreutz, and M. Tyers, “Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast.,” *Science*, vol. 297, no. 5580, pp. 395–400, 2002.
- [210] J. Zhang *et al.*, “Genomic scale mutant hunt identifies cell size homeostasis genes in *S. cerevisiae*,” *Curr. Biol.*, vol. 12, no. 23, pp. 1992–2001, 2002.
- [211] Y. Ohya *et al.*, “High-dimensional and large-scale phenotyping of yeast mutants.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 52, pp. 19015–20, 2005.
- [212] H. Dungalwala *et al.*, “Identification of new cell size control genes in *S. cerevisiae*.,” *Cell Div.*, vol. 7, no. 1, p. 24, 2012.
- [213] I. Soifer and N. Barkai, “Systematic identification of cell size regulators in budding yeast.,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 10, no. 11, p. 761, 2014.

- [214] E. Wilson, *The cell in development and heredity*. New York: Macmillan, 1925.
- [215] B. D. Mundkur, "Interphase nuclei and cell sizes in a polyploid series of *Saccharomyces*," *Experientia*, vol. 9, no. 10, pp. 373–4, Oct. 1953.
- [216] H. Tsukaya, "Controlling size in multicellular organs: Focus on the leaf," *PLoS Biol.*, vol. 6, no. 7. pp. 1373–1376, 2008.
- [217] W. F. Marshall *et al.*, "What determines cell size?," *BMC Biol.*, vol. 10, no. 1, p. 101, 2012.
- [218] P. A. Fantes, W. D. Grant, and R. H. Pritchard, "The Regulation of Cell Size and the Control of Mitosis," *J. Theor. Biol.*, vol. 50, pp. 213–244, 1975.
- [219] W. Donachie, "Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication," *Nature*, vol. 219, pp. 1077–1079, 1968.
- [220] L. Sompayrac and O. Maaløe, "Autorepressor Model for Control of DNA Replication," *Nature*, vol. 241, no. 109, pp. 133–135, 1973.
- [221] J. Berman, "Ploidy plasticity: A rapid and reversible strategy for adaptation to stress," *FEMS Yeast Res.*, vol. 16, no. 3, 2016.
- [222] L. Comai, "The advantages and disadvantages of being polyploid.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 6, no. 11, pp. 836–846, 2005.
- [223] Z. Storchova and D. Pellman, "From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 5, no. January, pp. 45–54, 2004.
- [224] A. M. Selmecki *et al.*, "Polyploidy can drive rapid adaptation in yeast," *Nature*, vol. 519, no. 7543, pp. 349–352, 2015.
- [225] A. A. Andalis, Z. Storchova, C. Styles, T. Galitski, D. Pellman, and G. R. Fink, "Defects arising from whole-genome duplications in *Saccharomyces cerevisiae*," *Genetics*, vol. 167, no. 3, pp. 1109–1121, 2004.
- [226] V. W. Mayer and A. Aguilera, "High levels of chromosome instability in polyploids of *Saccharomyces cerevisiae*," *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 231, no. 2, pp. 177–186, 1990.
- [227] B. A. Blount, T. Weenink, and T. Ellis, "Construction of synthetic regulatory networks in yeast," *FEBS Lett.*, vol. 586, no. 15. pp. 2112–2121, 2012.

- [228] N. A. Da Silva and S. Srikrishnan, "Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS Yeast Res.*, vol. 12, no. 2, pp. 197–214, 2012.
- [229] Y. Mileyko, R. I. Joh, and J. S. Weitz, "Small-scale copy number variation and large-scale changes in gene expression.,," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 43, pp. 16659–64, 2008.
- [230] R. Gnügge and F. Rudolf, "*Saccharomyces cerevisiae* Shuttle vectors," *Yeast*, Jan. 2017.
- [231] H. Ma, S. Kunes, P. J. Schatz, and D. Botstein, "Plasmid construction by homologous recombination in yeast," *Gene*, vol. 58, no. 2–3, pp. 201–216, 1987.
- [232] K. R. Oldenburg, K. T. Vo, S. Michaelis, and C. Paddon, "Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast," *Nucleic Acids Res.*, vol. 25, no. 2, pp. 451–452, 1997.
- [233] R. S. Sikorski and P. Hieter, "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*.,," *Genetics*, vol. 122, no. 1, pp. 19–27, 1989.
- [234] T. W. Christianson, R. S. Sikorski, M. Dante, J. H. Shero, and P. Hieter, "Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors," *Gene*, vol. 110, no. 1, pp. 119–122, 1992.
- [235] R. D. Gietz and S. Akio, "New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites," *Gene*, vol. 74, no. 2, pp. 527–534, 1988.
- [236] A. Hinnen, J. B. Hicks, and G. R. Fink, "Transformation of yeast.,," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 75, no. 4, pp. 1929–33, 1978.
- [237] A. Wach, A. Brachat, R. P??hlmann, and P. Philippsen, "New heterologous modules for classical or PCR??based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*," *Yeast*, vol. 10, no. 13, pp. 1793–1808, 1994.
- [238] V. Siewers, "An overview on selection marker genes for transformation of *Saccharomyces cerevisiae*," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1152, pp. 3–15, 2014.
- [239] G. Tschumper and J. Carbon, "Copy number control by a yeast centromere," *Gene*, vol. 23, no. 2, pp. 221–232, 1983.

- [240] B. J. Brewer and W. L. Fangman, "The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*," *Cell*, vol. 51, no. 3, pp. 463–471, 1987.
- [241] D. T. Stinchcomb, K. Struhl, and R. W. Davis, "Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator," *Nature*, vol. 282, no. 5734, pp. 39–43, 1979.
- [242] W. L. Fangman, R. H. Hice, and E. Chlebowicz-Sledziowska, "ARS replication during the yeast S phase," *Cell*, vol. 32, no. 3, pp. 831–838, 1983.
- [243] S. Westermann, D. G. Drubin, and G. Barnes, "Structures and functions of yeast kinetochore complexes.," *Ann. Rev. Biochem.*, vol. 76, pp. 563–91, 2007.
- [244] B. Futcher and J. Carbon, "Toxic effects of excess cloned centromeres.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 6, no. 6, pp. 2213–2222, 1986.
- [245] K. W. Runge, R. J. Wellinger, and V. a Zakian, "Effects of excess centromeres and excess telomeres on chromosome loss rates.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 11, no. 6, pp. 2919–2928, 1991.
- [246] E. H. Blackburn, "Artificial chromosomes in yeast," *Trends. Genet.*, vol. 1, no. C, pp. 8–12, 1985.
- [247] J. L. Hartley and J. E. Donelson, "Nucleotide sequence of the yeast plasmid," *Nature*, vol. 286, no. 5776, pp. 860–865, 1980.
- [248] G. D. Clark-Walker and G. L. Miklos, "Localization and quantification of circular DNA in yeast.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 41, no. 2, pp. 359–65, Jan. 1974.
- [249] A. B. Futcher and B. S. Cox, "Copy number and the stability of 2 μ circle-based artificial plasmids of *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Bacteriol.*, vol. 157, no. 1, pp. 283–290, 1984.
- [250] J. R. Broach and J. B. Hicks, "Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 μ circle," *Cell*, vol. 21, no. 2, pp. 501–508, 1980.
- [251] J. a Huberman, L. D. Spotila, K. a Nawotka, S. M. el-Assouli, and L. R. Davis, "The in vivo replication origin of the yeast 2 microns plasmid.," *Cell*, vol. 51, no. 3, pp. 473–81, 1987.
- [252] V. A. Zakian, B. J. Brewer, and W. L. Fangman, "Replication of each copy of the yeast 2 micron DNA plasmid occurs during the S phase," *Cell*, vol. 17, no. 4, pp.

- 923–934, 1979.
- [253] K. M. Chan, Y. T. Liu, C. H. Ma, M. Jayaram, and S. Sau, “The 2 micron plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*: A miniaturized selfish genome with optimized functional competence,” *Plasmid*, vol. 70, no. 1. pp. 2–13, 2013.
- [254] S. Velmurugan, X. M. Yang, C. S. M. Chan, M. Dobson, and M. Jayaram, “Partitioning of the 2-um circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*: Functional coordination with chromosome segregation and plasmid-encoded Rep protein distribution,” *J. Cell Biol.*, vol. 149, no. 3, pp. 553–566, 2000.
- [255] S. Scott-Drew and J. a Murray, “Localisation and interaction of the protein components of the yeast 2 mu circle plasmid partitioning system suggest a mechanism for plasmid inheritance.,” *J. Cell Sci.*, vol. 111 (Pt 1, pp. 1779–89, 1998.
- [256] P. Manivasakam, S. C. Weber, J. McElver, and R. H. Schiestl, “Micro-homology mediated PCR targeting in *Saccharomyces cerevisiae*.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 23, no. 14, pp. 2799–800, Jul. 1995.
- [257] S. C. Kowalczykowski, “An Overview of the Molecular Mechanisms of Recombinational DNA Repair,” *CSH Perspect. Biol.*, vol. 7, no. 11. 2015.
- [258] C. Casas, M. Aldea, C. Espinet, C. Gallego, R. Gil, and E. Herrero, “The AFT1 transcriptional factor is differentially required for expression of high-affinity iron uptake genes in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Yeast*, vol. 13, no. 7, pp. 621–637, 1997.
- [259] R. S. Mclsaac *et al.*, “Fast-acting and nearly gratuitous induction of gene expression and protein depletion in *Saccharomyces cerevisiae*.,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 22, no. 22, pp. 4447–59, 2011.
- [260] R. Mans *et al.*, “CRISPR/Cas9: A molecular Swiss army knife for simultaneous introduction of multiple genetic modifications in *Saccharomyces cerevisiae*,” *FEMS Yeast Res.*, vol. 15, no. 2, pp. 1–15, 2015.
- [261] K. S. Lee and D. E. Levin, “Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 12, no. 1, pp. 172–182, 1992.
- [262] C. Janke *et al.*, “A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new

- fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes.,” *Yeast*, vol. 21, no. 11, pp. 947–62, Aug. 2004.
- [263] J. E. Dicarlo, J. E. Norville, P. Mali, X. Rios, J. Aach, and G. M. Church, “Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. 7, pp. 4336–4343, 2013.
- [264] T. M. Joska, A. Mashruwala, J. M. Boyd, and W. J. Belden, “A universal cloning method based on yeast homologous recombination that is simple, efficient, and versatile,” *J Microbiol. Meth.*, vol. 100, pp. 46-51, 2014.
- [265] P. Jorgensen and B. F. Nicholas P. Edgington, Brandt L. Schneider, Ivan Rupes, Mike Tyers, “The Size of the Nucleus Increases as Yeast Cells Grow,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 18, no. December, pp. 986–994, 2007.
- [266] T. Stearns, H. Ma, and D. Botstein, “Manipulating yeast genome using plasmid vectors,” *Method. Enzymol.*, vol. 185. pp. 280–297, 1990.
- [267] S. Zaman, S. I. Lippman, X. Zhao, and J. R. Broach, “How *Saccharomyces* responds to nutrients.,” *Annu. Rev. Genet.*, vol. 42, pp. 27–81, 2008.
- [268] R. Loewith and M. N. Hall, “Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control,” *Genetics*, vol. 189, no. 4. pp. 1177–1201, 2011.
- [269] M. Costanzo *et al.*, “CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast,” *Cell*, vol. 117, no. 7, pp. 899–913, 2004.
- [270] F. Schirmaier and P. Philippsen, “Identification of two genes coding for the translation elongation factor EF-1 alpha of *S. cerevisiae*.,” *EMBO J.*, vol. 3, no. 13, pp. 3311–5, 1984.
- [271] D. Mumberg, R. Müller, and M. Funk, “Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds,” *Gene*, vol. 156, no. 1, pp. 119–122, 1995.
- [272] W. A. E. Wells and A. W. Murray, “Aberrantly segregating centromeres activate the spindle assembly checkpoint in budding yeast,” *J. Cell Biol.*, vol. 133, no. 1, pp. 75–84, 1996.
- [273] H. Sato and S. Saitoh, “Switching the centromeres on and off: epigenetic chromatin alterations provide plasticity in centromere activity stabilizing aberrant dicentric chromosomes,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 41, no. 6, 2013.

- [274] J. E. Haber, P. C. Thorburn, and D. Rogers, "Meiotic and mitotic behavior of dicentric chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*," *Genetics*, vol. 106, no. 2, pp. 185–205, 1984.
- [275] K. G. Hardwick, R. C. Johnston, D. L. Smith, and A. W. Murray, "MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p," *J. Cell Biol.*, vol. 148, no. 5, pp. 871–882, 2000.
- [276] E. Garí, T. Volpe, H. Wang, C. Gallego, B. Futcher, and M. Aldea, "Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin CLN3 to modulate cell fate in budding yeast," *Gene Dev.*, vol. 15, no. 21, pp. 2803–2808, 2001.
- [277] K. Kitagawa *et al.*, "Requirement of Skp1-Bub1 Interaction for Kinetochore-Mediated Activation of the Spindle Checkpoint," *Mol. Cell*, vol. 11, no. 5, pp. 1201–1213, May 2003.
- [278] P. Uetz *et al.*, "A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*," *Nature*, vol. 403, no. 6770, pp. 623–7, Feb. 2000.
- [279] K. M. Schmoller, J. J. Turner, M. Koivomagi, and J. M. Skotheim, "Dilution of the cell cycle inhibitor Whi5 controls budding-yeast cell size," *Nature*, vol. 526, no. 7572, pp. 268–272, 2015.
- [280] J. A. Daniel, B. E. Keyes, Y. P. Y. Ng, C. O. Freeman, and D. J. Burke, "Diverse functions of spindle assembly checkpoint genes in *Saccharomyces cerevisiae*," *Genetics*, vol. 172, no. 1, pp. 53–65, 2006.
- [281] D. T. C. Lau and A. W. Murray, "Mad2 and Mad3 cooperate to arrest budding yeast in mitosis," *Curr. Biol.*, vol. 22, no. 3, pp. 180–190, 2012.
- [282] E. M. Torres *et al.*, "Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast," *Science*, vol. 317, no. 5840, pp. 916–24, 2007.
- [283] R. R. Thorburn *et al.*, "Aneuploid yeast strains exhibit defects in cell growth and passage through START," *Mol. Biol. Cell*, vol. 24, no. 9, pp. 1274–89, 2013.
- [284] Z. Storchová *et al.*, "Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast," *Nature*, vol. 443, no. 7111, pp. 541–547, 2006.
- [285] T. Galitski, a J. Saldanha, C. a Styles, E. S. Lander, and G. R. Fink, "Ploidy regulation of gene expression," *Science*, vol. 285, no. 5425, pp. 251–254, 1999.

- [286] K. Kitagawa, D. Skowyra, S. J. Elledge, J. W. Harper, and P. Hieter, "SGT1 encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex," *Mol. Cell*, vol. 4, no. 1, pp. 21–33, 1999.
- [287] A. Poddar, P. T. Stukenberg, and D. J. Burke, "Two complexes of spindle checkpoint proteins containing Cdc20 and Mad2 assemble during mitosis independently of the kinetochore in *Saccharomyces cerevisiae*," *Eukaryot. Cell*, vol. 4, no. 5, pp. 867–78, May 2005.
- [288] A. Musacchio and E. D. Salmon, "The spindle-assembly checkpoint in space and time.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 5, pp. 379–93, May 2007.
- [289] E. a Foley and T. M. Kapoor, "Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 14, no. 1, pp. 25–37, 2013.
- [290] G. W. Charville and T. A. Rando, "Stem cell ageing and non-random chromosome segregation," *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.*, vol. 366, no. 1561, 2010.
- [291] B. E. Keyes, K. D. Sykes, C. E. Remington, and D. J. Burke, "Sister Chromatids Segregate at Mitosis Without Mother–Daughter Bias in *Saccharomyces cerevisiae*," *Genetics*, vol. 192, no. 4, 2012.
- [292] P. Rocheteau, B. Gayraud-Morel, I. Siegl-Cachedenier, M. A. Blasco, and S. Tajbakhsh, "A Subpopulation of Adult Skeletal Muscle Stem Cells Retains All Template DNA Strands after Cell Division," *Cell*, vol. 148, no. 1, pp. 112–125, 2012.
- [293] T. A. Rando, "The Immortal Strand Hypothesis: Segregation and Reconstruction," *Cell*, vol. 129, no. 7. pp. 1239–1243, 2007.
- [294] J. Fu, I. M. Hagan, and D. M. Glover, "The centrosome and its duplication cycle," *CSH Perspect. Biol.*, vol. 7, no. 2. p. a015800, 2015.
- [295] J. Reina and C. Gonzalez, "When fate follows age: unequal centrosomes in asymmetric cell division.," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 369, no. 1650, pp. 25–28, 2014.
- [296] R. L. Weaver, J. F. Limzerwala, R. M. Naylor, K. B. Jeganathan, D. J. Baker, and

- J. M. van Deursen, “BubR1 alterations that reinforce mitotic surveillance act against aneuploidy and cancer,” *Elife*, vol. 5, p. e16620, 2016.
- [297] D. J. Baker *et al.*, “Increased expression of BubR1 protects against aneuploidy and cancer and extends healthy lifespan,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 1, pp. 96–102, 2012.
- [298] G. J. Steel, C. Harley, a Boyd, and a Morgan, “A screen for dominant negative mutants of SEC18 reveals a role for the AAA protein consensus sequence in ATP hydrolysis.,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 11, no. 4, pp. 1345–56, 2000.
- [299] J. Bloom and F. R. Cross, “Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control.,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 2, pp. 149–160, 2007.
- [300] D. Vucic, V. M. Dixit, and I. E. Wertz, “Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death.,” *Nat. Rev Mol Cell Biol*, vol. 12, no. 7, pp. 439–452, 2011.
- [301] W. Jonkers and M. Rep, “Lessons from fungal F-box proteins.,” *Eukaryot. Cell*, vol. 8, no. 5, pp. 677–95, May 2009.
- [302] Y. Yamagishi, T. Sakuno, Y. Goto, and Y. Watanabe, “Kinetochores composition and its function: Lessons from yeasts,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 38, no. 2, pp. 185–200, 2014.
- [303] S. Sivakumar and G. J. Gorbsky, “Spatiotemporal regulation of the anaphase-promoting complex in mitosis,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 16, no. 2, pp. 82–94, 2015.
- [304] N. S. Hill, R. Kadoya, D. K. Chattoraj, P. A. Levin, and P. Hughes, “Cell Size and the Initiation of DNA Replication in Bacteria,” *PLoS Genet.*, vol. 8, no. 3, p. e1002549, Mar. 2012.
- [305] E. Baena *et al.*, “c-Myc regulates cell size and ploidy but is not essential for postnatal proliferation in liver.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 20, pp. 7286–91, May 2005.
- [306] H. Tsukaya, “Does ploidy level directly control cell size? Counterevidence from Arabidopsis genetics.,” *PLoS One*, vol. 8, no. 12, p. e83729, 2013.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradecer a la Universidad Internacional de Cataluña la posibilidad que me ha otorgado para formarme como investigador, profesional y como persona. Una universidad joven pero que aporta a la sociedad profesionales con un alto nivel. E incluir en ellas todas las personas que la forman con las que he podido coincidir. Les deseo un futuro próspero y con grandes éxitos.

De entre todos los miembros de la UIC destacar a Dr. Josep Clotet Erra, que depositó su confianza tanto en mí como en la investigación, desde que nos conocimos. Su visión crítica, su duro trabajo, su pasión por la ciencia, su paciencia y su capacidad de transmitir conocimiento ha generado un punto de inflexión en mi visión sobre la ciencia. Siendo para mí un científico modelo a seguir y siendo un placer haber tenido la posibilidad de compartir esta etapa. Si soy doctor, es gracias a ti. Nunca tendré suficientes palabras para agradecerle todo lo que me has aportado.

Agradecer al Dr. Martí Aldea Malo, por haberme permitido establecerme en su laboratorio y trabajar como un científico pleno de primera liga. Por habernos aportado la idea en la que se basa este proyecto y por su larga colaboración. En mis dos últimos años he podido crecer como científico, con tu visión, tu trabajo, tus múltiples conocimientos en varios campos y tu ayuda. A sido un placer poder compartir esta etapa contigo y espero que algún día me adoptes como hijo, para poder seguir disfrutando de los platos que preparas.

También destacar al Dr. Javier Jiménez Jiménez, que me has entregado rigurosidad, ambición científica, un gran aporte de tu sabiduría forjada en tu larga experiencia científica, has abordado muchísimas preguntas mías y has tenido una paciencia extrema con tanto papel que rellenar y entregar. No podré olvidar tus divertidos momentos en el laboratorio y tus chistes haciendo un café en la entrada.

Agradecer a todos mis compañeros con los que he tenido el placer en mi grupo de la UIC: Sara, Naty, Samu, Oriol, Sergio, Abril, Eva, Eli, Marta y a mis compañeros del grupo del IBMB: Eva, Galal, David, Pedro, Sara, Miren, Raúl y Carme. También al grupo de Nuria, Marta Palito, Mari Carmen, Ruth.

A Sara, por haber sido tan buena compañera y amiga. Has sido para mí la referente cuando llegué y la primera persona en la que confié. He disfrutado contigo de momentos geniales y también has sido mi pañuelo múltiples veces, que han mantenido mi cordura.

AGRADECIMIENTOS

A Naty siempre estabas hay con una sonrisa y para ayudar en todo, especialmente para las clases de master, muy importantes para mantener las ganas de trabajar día a día.

A Samu, que decir, buen compañero y mejor amigo, ha sido un placer poder trabajar contigo mano a mano y disfrutar de la ciencia, y lo mejor han sido las fiestas pilar fundamental en ellas.

Eva, mi canaria favorita, con tu templanza y comprensión siempre para ayudar y escuchar. Gracias estar ahí en todos esos momentos desastrosos y para fumar.

Eli con tus idas y venidas, eres genial siempre al pie del cañón para todo especialmente para hacer de un día de trabajo un día divertido.

Marta mi técnico absoluto, que espero poder contratar en un futuro. Eres una de las mejores personas que he tenido el placer de conocer en el laboratorio, has sido técnico, pañuelo, estanco, amiga, y muchas cosas más.

¿Palito que hubiese sido sin ti las noches en el lab? Muchas gracias por todos esos locos momentos.

Oriol estás loco, gracias por todos esos buenos momentos en el laboratorio y por ser el segundo pilar de las fiestas.

Eva, mi lleidatana favorita, como decirlo tú has sido mi referente, amiga, compañera tanto en el trabajo como en el juego durante mi segunda etapa de la tesis. Ha sido un placer poder conocerte y sobre todo poder viajar contigo para iluminar a todo el mundo. Gracias por aguantar mis locuras y por estar ahí para todo.

Y finalmente, sin querer olvidarme de nadie, a todos los miembros del grupo del Dr. Antonio Villaverde en la UAB. Universidad que me vió nacer como científico y grupo que me dio la oportunidad de conocer la ciencia. Especialmente, agradecer a la Dra. Elena García Fruitós, la primera persona que me dirigió y que me ayudo a coger ritmo, y que en algunos momentos hice pasar momentos pesados, pero me ilumina con su trabajo su simpatía y su pasión a la ciencia. A Olivia Cano, una gran amiga y compañera que me ayudo en todo momento desde la carrera hasta hoy en día. A Ugutz, Paolo, Mireia, Joaquin, Fran, Neus, Rosa, Pepe, Esther, a todos muchas gracias.

Gracias, a todos los que habéis pasado por mi vida durante la tesis y a todos los que me he olvidado de mencionar, más que nada para no ocupar el espacio de otra tesis. Todos habéis aportado algo en mi muy importante que me ha hecho crecer como persona de forma inesperada, por todas las vivencias, todos los buenos y malos momentos, ahora solo queda caminar hacia adelante.