

Regulación de la separasa mediada por el nuevo papel de Sak1 en mitosis

David Vaquero Pelaz





UNIVERSITAT DE BARCELONA

Tesis doctoral 2023

David Vaquero Pelaz Dirigido: Dra. Ethel Queralt Badía

Regulación de la separasa mediada por el nuevo papel de Sak1 en mitosis

David Vaquero Pelaz TESIS DOCTORAL

Regulación de la separasa mediada por el nuevo papel de Sak1 en mitosis

Tesis presentada por David Vaquero Pelaz para optar al grado de Doctor por la *Universitat de Barcelona*.

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección de la Doctora Ethel Queralt Badía en el Programa de Epigenética y Biología del Cáncer, IDIBELL; y posteriormente, en la Unidad de División celular y Cohesinopatías, IBV-CSIC.

Programa de Doctorado de Biomedicina de la Universitat de Barcelona.

Firma del director

Firma del autor

Firma del tutor

Ethel Queralt





David Vaquero



Rosa María Aligué





Portada, contraportada y páginas de sección a cargo de Clara Rubio Reche.



El presente trabajo "Regulación de la separasa mediada por el nuevo papel de Sak1 en mitosis" realizado por David Vaquero Pelaz, se ha llevado a cabo con el apoyo financiero del Ministerio de Ciencia e Innovación mediante las ayudas para contratos predoctorales para la formación de doctores 2017 (BES-2017-080353) a cargo del proyecto PID2019-109027GB-100, como investigadora principal del proyecto Dra. Ethel Queralt Badia, en los centros de investigación Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL) e Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC).



AGRADECIMIENTOS

Miro hacia atrás y recuerdo esos momentos en los que no veía un final para esta tesis. Todos los problemas, cambios y demás desventuras por los que he pasado para llegar hasta aquí, por suerte, no los he pasado sólo. Recordar todo esto, me hace darme cuenta de lo afortunado que he sido al recorrer este camino junto con mi familia y todas las personas que han ido pasando por mi vida durante estos 5 largos años, dos ciudades y tres casas. Espero que todo el trabajo recogido en estas páginas sirva para alguien en un futuro. Tanto si estás al inicio de tu tesis o al final, o si llegaste aquí por casualidad, el mejor consejo que me han dado, que más me ha ayudado al final de esta etapa y que yo te puedo decir a ti es: no puedes controlarlo todo. Las cosas pasan, y lo que tenga que ser, será. Y en ese camino, lo más importante son las personas con las que lo recorres, porque sin el apoyo de todos ellos no habría llegado hasta aquí y no sería quien soy.

Gracias, Papá, gracias, Mamá. Gracias por haberme apoyado, a veces entendiendo porque quería seguir adelante, otras veces sin entender porque elegía un camino que no me iba a dar estabilidad, ni hacerme rico, ni famoso, ni si quiera a veces lo mínimo como trabajador. Gracias, Mamá, por enseñarme a preocuparme por los demás, a no desistir en aquello que quieres conseguir y descubrir mi interés por la ciencia. Gracias, Papá, por descubrirme la naturaleza, desarrollar mi curiosidad y las ganas por mi montar y desmontar todo lo mecánico y electrónico que no funcionaba bien. Os debo todo lo que soy y dónde he llegado, gracias por todo, excepto por seguirme preguntando si como fruta, si me he lavado los dientes o si he apagado la luz de mi habitación, ya tengo 32 años. Gracias, Raquel, por importarte lo que hago y por preocuparte por mí, por recurrir a mí pensando que lo sé todo y lo puedo arreglar todo. Gracias a mi familia por las comilonas de los domingos, los buenos ratos, las risas (y las discusiones) y que pese a nuestras diferencias y al paso del tiempo sigamos estando unidos. Gracias a mis abuelos que ya no están, Andrés y Josefa, siento no poder celebrarlo con vosotros, siempre recordaré las sopas de ajo y los macarrones al horno que hacíais. También gracias a ti Rohan, porque me encantaban tus espadas y todo lo friki que nos unía. Ahora que vuelvo a tener algo de tiempo para mí, me habría encantado que me enseñaras a tocar la armónica. Os llevo en mis recuerdos y esta tesis me gustaría dedicárosla.

Gracias, Pinto, o como se le conoce ahora, Sr. Abogado Javier Pinto Arranz, por estar conmigo desde el principio y seguir estándolo, por haber podido contar contigo siempre, por tu confianza, por las risas y tus chulerías. Gracias, Srijana, Clara, Ángel, Alicia y Rafa, por ser mi segunda familia, por los viajes, las comilonas, las payasadas, Encarnita, la "drogja" en el ColaCao, por las risas hasta tener agujetas, por las historias que repetimos una y otra vez. Gracias, Teresa, por ser mi apoyo, por la confianza, por los viajes y los sitios increíbles que visitamos, gracias por ser mi doctora para todos los males. Gracias a todo el grupo de "Corajeros verdaderos" por las risas con las historias del instituto, los cotilleos, las movidas a lo física o química, pero sobre todo, gracias a Soledad, profesora de química que me dijo que nunca acabaría una carrera de ciencias. Soledad, esta tesis, te la dedico (espere sentada señora, que en breve le llega la tesis de Elisa también). Gracias a mis queridos "Biotecs", "Conqueros lovers" y toda la gente de la facultad de biología. Algunos más lejos, otros más cercanos, Leticia, Isita, Jorge, Andrés, Manuel, Meira, Janire, Mario, Fran (Viva la Residencia Oviedo) todos formáis parte de una de mis mejores etapas. Gracias, Dra. Sacristán, por darme la oportunidad de confirmar que el trabajo de laboratorio era lo que me gustaba. María, me diste la oportunidad de trasladar lo que aprendíamos en las clases en algo real, algo práctico y cercano a lo que sería mi futuro. Sin la oportunidad que me diste de poder estar en tu laboratorio esto hoy no sería posible. Aun me acuerdo de Avelino canturreando por el laboratorio y guardando el Kitkat en el frigorífico, gracias. Gracias, Marié, Mariel, Jara Juana, Gus, Raquel y demás charros por descubrirme Salamanca y a mí mismo.

A DAMPANDANDANDANDANDAN

Gracias a toda la gente del Máster de Alcalá que me acogió en una ciudad y una etapa nuevas, gracias, Álvaro, Raquel, Macarena, Mari Carmen, Javi, Juanma, las experiencias con vosotros valen mil veces más que los créditos del máster "nombre muy largo, I+D". Gracias Irene "Gigi" por la complicidad y por mantenerme cerca, aunque estemos lejos y por las llamadas interminables. Gracias, Munchi, por dejarme ser parte de tu vida, por colarnos en cines, por las palmeras de chocolate y el zumo de naranja los domingos, por los chistes malos y por tu oposición al sistema. Gracias a toda la gente de PharmaMar por acogerme y formarme. Teníais razón, muchas de las cosas que me advertisteis se han cumplido. Gracias a mis frikis a distancia favoritos, Mari Carmen y Guille, por todos esos momentos intentando echar al otro cuando dejaba el ordenador para ir al baño o beber agua y por todos esos sustos que se ha llevado Mari Carmen.

Gràcies a tota la gent de Barcelona. Gracias a mis compis de piso Laura, Sandra y Gloria. Gracias por esas partidas de catán, tardes de series, panetones, la alpaca Paca y demás juegos de mesa. Gracias Laura y Gloria por aguantarme toda una cuarentena. Gracias, PEBC5, por soportar mis inicios, mis torpezas y mi ancla. Gracias, Ethel, por darme la oportunidad de realizar lo que siempre quise, investigar y poder tener un doctorado. Perdón por mis despistes, indecisiones, mis cursivas cuando no eran y mis no cursivas cuando sí eran, mis chapuzas y mis inventos de bombero. He aprendido de ti y soy investigador gracias a ti, así que espero que estés orgullosa, porque para la bueno y lo malo, en mi ciencia y mi futuro siempre serás una parte de mí. Yolanda, gracias por ser mi otra mitad del laboratorio, por aguantar mis frikadas, por escucharme y por darme mi espacio cuando lo necesitaba. Aunque te haga gracia pensarlo, somos un poco como el blanco y el negro, como dos hermanos o como un matrimonio de 60 años, a veces nos queremos matar, pero sabes que puedes confiar 100% en el otro. Ana, gracias por animarme todos los día, por ser la energía del laboratorio, por ponerme las pilas con el ancla, por los "jajas" y las fiestas, la Britney más marchosa. Gracias, Marta, por apoyarme con mis chistes malos, la afición por los juegos de mesa y las charlas sobre temas absurdos. María, gracias por ayudarme a soportar a las tres anteriores, por poner cabeza y sentido común. Se nota que tienes buen ojo, elegiste un Vaquero como jefe y un Vaquero como amigo. Gracias Jess por heredar mi ancla (y lo sabes) y por las risas metiéndonos con las otras cuatro. Gracias, Patri y Jose, por ser la voz de la cordura del laboratorio (aunque Jose a veces no tanto). Gracias a Jorge, Mireia, Isaac, Nuria, Rafa, Diana y Ro por esas barbacoas guapas y esas escapadas aún más chulas. Espero poder volver a prepararos el tartar de salmón y compartir más panetones con vosotros. Gracias a Sergi, Mar y Marc por dejarme ser un panoli más junto a vosotros, porque nunca se sabe cuándo alguien te puede echar un dragón "escupefuego" indestructible con 50000 de ataque. Gracias por la complicidad, las risas hasta mearme y las noches en vela jugando o comiendo hasta reventar. Gracias, Maribel, por hacerme sentir un friki especial y los buenos momentos a tu lado. Gracias, Ayla, por tu paciencia conmigo y ayudarme a encontrar la tranquilidad en un momento de mi vida tan caótico. Gracias a todas las personitas de Barcelona que pasasteis por mi vida, aunque fuera brevemente, sois parte de mi experiencia y mi historia de vida.

Gracias a toda la gente del IBV, me acogisteis y me hicisteis sentir como si de una pequeña familia se tratara cuando no se podía ni ir a comprar al super más tarde de las seis de la tarde. Todos dispuestos a ayudarme, todos y cada uno de vosotros sois un pequeño tesoro que por suerte apareció en la etapa más difícil de mi vida. Gracias, Malina, hay una cosa que tienes en común con Yolanda, pasar mucho tiempo conmigo. Por tanto, a ti también te digo, gracias por tu paciencia, por aguantar mis bromas, mis sustos y lo siento, porque una vez pasas tantas horas conmigo, si tú me dejas, estaré a tu lado siempre que me necesites (aunque no sea capaz de darme cuenta si te cortas el pelo o no). Gracias, Paco, por ayudarme como nadie, por estar siempre ahí por si necesitaba una mano, por tu energía, por ser tan buena persona, ojalá algún día pueda devolverte el doble de lo que me has aportado tú. Ana, gracias por los videos de gatos a las 2 de la mañana, tus dramas, las conversaciones sobre datos curiosos y perdón por mis zancadillas. Juanju, gracias por las risas, los momentos chorras, saberte de memoria el 100% del reguetoneo clásico y desplegar los pasos prohibidos. Anmol, thanks for your chill, for helping me with my bad English, for your special jokes and for sharing your geek interest with me. Esther, gracias por ayudarme y repartir esta carga de final de la tesis, por las risas y los lloros con Westerns, por estar a las duras y a las maduras, por confiar en mí y apoyarme. Gracias, Fernando, por los: ssiiiiii, bueno vamos a ver. Fernando, a veces, se te va la olla, pero entonces te veo en modo padre y me doy cuenta de que tienes un corazón que no te cabe en el pecho de grande. Gracias, Amparo, por esa positividad y esa sonrisa que contagias al resto del laboratorio. Gracias, Marina, por nuestros chistes frikis que nadie más entendía y nuestras cosas de gente del norte. Gracias, Irving, por tus consejos y por aguantar mis chistes malos mejicanos (y por el tequila). Gracias, Lola, por preocuparte por mí cuando la tesis podía conmigo y ayudarme a desconectar. Gracias a todos los del IBV, de verdad, la lista sería larguísima, con todos he pasado tardeos, cervezas, casas rurales fenomenales. Gracias a todos de verdad, habéis sido mi motor en los tiempos más difíciles. Gracias, Clara, por ser mi barco en la tormenta, por ser el haz de luz en las tinieblas. Gracias por ser y por estar, por permitirme estar a tu lado, por hacerme un hueco en tu vida y darme tanta paz. Gracias a todos los que habéis sido parte de esta etapa de mi vida, esta tesis también es vuestra. GRACIAS.





INTRODUCCIÓN	27
2.1. Fases del ciclo celular	29
2.2. Regulación del ciclo celular	
2.2.1. Regulación de los complejos Cdk-ciclina	32
2.2.2. Regulación de la degradación de las proteínas	
del ciclo celular	
2.2.3. Regulación de los puntos de control del ciclo celular	
2.3. La Mitosis	43
2.3.1. La transición Metafase-anafase.	43
2.3.2. La Salida de mitosis	45
2.3.3. La vía FEAR	47
2.3.4. La vía MEN	49
2.4. La separasa	51
2.4. 1 Estructura de la separasa	53
2.4.2. La securina	54
2.4.3. El complejo cohesina	56
2.4.4. Función de la separasa	60
2.4.5. Regulación de la separasa	60
2.5. La proteína Sak1	63
COBJETIVOS.	71
METODOLOGÍA .	75
3.1. Plásmidos y cepas	75
3.1.1. Plásmidos	75
3.1. 2 Cepas de levadura.	76
3.2. Condiciones de cultivo	81
3.2.1. Sincronización de células en mitosis mediante	
deplección de Cdc20	81
3.2.2. Inactivación de los alelos mutantes condicionales	81
3.2.3. Sobreexpresión de <i>SAK1</i> y <i>ESP</i> 1	82
3.3. Técnicas de manipulación genética	82
3.3.1. Transformación de levadura	82
3.3.2. Conjugación y disección de tétradas	83
3.4. Técnicas de estudio de proteínas	83
3.4.1. Western blot	83
3.4.2. Phos-tag [®]	

3.4.3. Anticuerpos	
3.4.4. Coinmunoprecipitación de proteínas	
3.4.5. Purificación de Esp1-TEV	
3.4.6. Inmunoprecipitación de Sak1 y ensayo quinasa	
3.5. Técnicas de microscopía	
3.5.1. Inmunofluorescencia <i>in situ</i>	
3.5.2 . Microscopía de fluorescencia <i>in vivo</i>	
3.6. Citometría de flujo	
3.7. Programas utilizados	
3.7.1. Análisis estadístico	
3.7.2. Otros programas	
CRESULTADOS	
4.1. <i>esp1-2 sak1-G150A</i> y <i>esp1-2 pah1-C549T</i> son mutantes	
supresores de <i>esp1-2.</i>	93
4.2. <i>PAH1</i> presenta interacciones gené-ticas con <i>ESP1</i>	96
4.3. SAK1 interacciona genéticamente con ESP1	100
4.4. La relación entre <i>SAK1</i> y <i>ESP1</i> no depende de <i>SNF1</i>	103
4.4.1. La interacción genética entre <i>ESP1</i> y <i>SAK1</i> no	
depende de SNF1	
4.4.2. La relación entre Sak1 y la separasa no depende	
de la fosforilación T210 de Snf1.	106
4.5. El mutante supresor <i>esp1-2 sak1-G150A</i> recupera las tres	
principales funciones promovidas por la separasa en mitosis	107
4.6. La sobreexpresión de <i>SAK1</i> en el mutante <i>esp1-2</i> recupera las	
funciones promovidas por la separasa en mitosis	112
4.7. El mutante <i>esp1-2 Δsak1</i> no muestra diferencias en la	
progresión en mitosis respecto al mutante sencillo esp1-2	112
4.7. Papel Sak1 en la activación Cdc14	113
4.7.1. La sobreexpresión de <i>SAK1</i> por si sola no activa a Cdc14	114
4.7.2. El mutante <i>∆sak1</i> presenta un retraso en la liberación	
de la fosfatasa Cdc14 al inicio de la anafase	116
4.8. Sak1 es un nuevo COMPONENTE DE LA vía FEAR	
4.8.1. El mutante doble <i>Δsak1 cdc15-2</i> muestra un menor	
crecimiento que el mutante sencillo <i>cdc15-2.</i>	
4.8.2. <i>SAK1</i> presenta interacciones sintético letales con <i>CDC14</i>	

de corte de la separasa en el mutante *esp1-2*.....125

4.10. El mutante supresor *esp1-2 sak1-G150A* recupera la capacidad

D

D

P

4.11. La sobrexpresión ectópica de la separasa en el mutante	
sak1-G150A, en ausencia de Cdc20, permite la progresión	
en mitosis	131
4.12. Sak1 y la separasa interaccionan físicamente durante la mitosis	136
4.13. Sak1 fosforila a la separasa in vitro e in vivo.	138
4.13.1. La ausencia de Sak1 disminuye los niveles de la separasa	
fosforilada <i>in vivo</i>	139
4.14. Sak1 regula la localización nuclear de la separasa en mitosis	141
DISCUSIÓN.	149
5.1. Discusión de los resultados de <i>PAH1</i>	 152
5.2. Discusión de los resultados de <i>SAK1</i>	154
5.2.1. Sak1 es un regulador positivo de la separasa	154
5.2.3. Sak1 fosforila a la separasa y regula su localización subcelular	159
5.2.4. Relevancia funcional de la regulación de separasa por <i>Sak</i> 1	164
CONCLUSIONES.	173
BIBLIOGRAFÍA	177







El ciclo celular es un conjunto ordenado de sucesos que tienen como fin el crecimiento de una célula y su división en dos células hijas. Uno de los sucesos más relevantes en el ciclo celular es la correcta segregación del material genético de la célula parental a sus células descendientes durante la mitosis. Una proteína clave encargada de iniciar este proceso es la separasa, que lleva a cabo la escisión del complejo cohesina, permitiendo la separación de las cromátidas hermanas y su distribución en las células descendientes. Debido a la suma importancia que tiene para la célula este proceso para asegurar la correcta transmisión de la información genética a las células hijas, la separasa se encuentra altamente regulada a diferentes niveles durante la mitosis. Además de su función en el corte del complejo cohesina, la separasa también promueve la activación de la fosfatasa Cdc14, la elongación del huso mitótico y regula la condensación y resolución del ADN ribosómico. Pese a la relevancia de la separasa en el ciclo celular, no se conoce por completo como promueve todas las funciones que desarrolla en mitosis y aún quedan por resolver preguntas respecto a su regulación. En esta tesis utilizamos la levadura de gemación *S. cerevisiae* para estudiar nuevas funciones de la separasa y su regulación. Previamente, en este laboratorio se llevó a cabo un rastreo genético del alelo termosensible de la separasa, esp1-2, dónde se aislaron varios mutantes supresores de esp1-2 con el fin de identificar nuevos posibles sustratos de la separasa. En el trabajo realizado en esta tesis doctoral se validaron las mutaciones sak1-G150A y pah1-C549T como mutaciones supresoras del alelo esp1-2. Pah1 es una fosfatasa que regula la dinámica de síntesis de la membrana nuclear en respuesta a las señales metabólicas de la célula. Hemos demostrado que PAH1 y ESP1 interaccionan genéticamente, por lo que convierten a Pah1 y al supresor esp1-2 pah1-C549T en grandes candidatos para seguir estudiando nuevas funciones reguladas por la separasa. Por otro lado, Sak1 es la principal quinasa activadora de la vía de Snf1, que regula los cambios en el metabolismo de la célula en función de la disponibilidad de glucosa o diferentes tipos de estrés. Los resultados de este trabajo demuestran que Sak1 y la separasa interaccionan física y genéticamente, independientemente de la función de Sak1 activando a Snf1. También, hemos demostrado que el mutante supresor esp1-2 sak1-G150A recupera todas las funciones promovidas por las separasa en mitosis. El retraso en la liberación de la fosfatasa Cdc14 y la letalidad sintética con diferentes componentes de la vía MEN en el mutante $\Delta sak1$ señalan que Sak1 podría ser un componente de la vía FEAR. Además, nuestros resultados muestran que Sak1 fosforila a la separasa durante la mitosis y regula la localización nuclear de la separasa. Por consiguiente, los datos aportados por el trabajo de esta tesis doctoral postulan a la quinasa Sak1 como nuevo interactor de la separasa, regulando sus funciones y su localización subcelular durante la mitosis. Esta nueva conexión entre Sak1 y la separasa proporciona un gran avance en el conocimiento sobre la regulación de la separasa.

TPANIPANIPANIPANIPANIPANIPANIPANI

The cell cycle is a series of ordered events whose purpose is the growth of a cell and its division into two daughter cells. One of the most relevant events in the cell cycle is the correct segregation of genetic material from the parent cell to its daughter cells during mitosis. The key protein responsible for this process is separase, which carries out the cleavage of the cohesin complex allowing the separation of the sister chromatids and their distribution to the daughter cells. Due to the importance of this process for the cell, to ensure the correct transmission of genetic information to the daughter cells, separase is highly regulated at multiple levels during mitosis. In addition to its role in cleaving the cohesin complex, separase also promotes the activation of the Cdc14 phosphatase, the elongation of the mitotic spindle, and regulates the condensation and resolution of the ribosomal DNA. Despite the relevance of separase in the cell cycle, it is not fully understood how it promotes all its functions in mitosis, and there are still questions to be answered about its regulation. In this thesis, we used budding yeast S. cerevisiae to study new functions of separase and its regulation. Previously, a genetic screening of the temperature-sensitive separase allele , *esp1-2*, was performed in this laboratory, where several suppressor mutants of *esp1-2* were isolated with the goal of identifying new potential substrates of separase. In the work carried out in this thesis, we validated the mutations *sak1-G150A* and *pah1-C549T* as suppressor mutations of the esp1-2 allele. Pah1 is a phosphatase that regulates the nuclear membrane dynamics in response to cell metabolic signals. We have demonstrated that PAH1 and ESP1 interact genetically, making Pah1 and the *esp1-2 pah1-C549T* suppressor mutant strong candidates for further study of new functions regulated by separase. On the other hand, Sak1 is the main activator kinase of the Snf1 pathway, which regulates changes in cell metabolism in response to the availability of glucose or different types of stress. The results of this work show that Sak1 and separase interact physically and genetically, independently of Sak1's function in activating Snf1. Additionally, we have demonstrated that the *esp1-2 sak1-G150A* suppressor rescues all the functions promoted by separase in mitosis. The delay in the release of Cdc14 phosphatase and the synthetic lethality with different components of the MEN pathway in the $\Delta sak1$ mutant suggest that Sak1 could be a component of the FEAR pathway. Furthermore, our results show that Sak1 phosphorylates separase in mitosis and regulates its localization in the nucleus. Therefore, the data provided by the work in this thesis suggest that Sak1 is a new interactor of separase, regulating its functions and its subcellular localization during mitosis. This new connection between Sak1 and separase represents a significant advance in the understanding of the regulation of separase activity.

TPANIPANIPANIPANIPANIPANIPANIPANIPANI



INTRODUCCIÓN



El ciclo celular es un conjunto ordenado de procesos biológicos mediante los cuales la célula crece y se divide en dos nuevas células... Este mantra, es la frase con la que empieza toda tesis, artículo o conferencia sobre ciclo celular que se precie. Es la definición exacta y concisa, pero a base de repetirla, hemos dejado de lado el contexto y la importancia que implica lo que es el ciclo celular. El ciclo celular es el fundamento de la complejidad de la vida misma; es la forma de reproducción en los organismos unicelulares; es la formación de las flores en el meristemo floral; la formación de las hojas en el meristemo apical del tallo y la extensión de la raíz en el meristemo radicular; es la base para la formación de gametos; son todas las divisiones de segmentación del cigoto, desde que se convierte en mórula, pasando por blastocisto hasta llegar a embrión; es la formación de un individuo adulto; es el desarrollo de todos y cada uno de nuestros órganos; es la renovación celular de la piel; es la formación de las células sanguíneas y es en parte el ciclo de la vida. Todos y cada uno de estos casos están comandados por un conjunto ordenado de sucesos, que tiene como fin el crecimiento de una célula parental y su duplicación en dos células descendientes, todos con sus diferencias, matices y especializaciones en este proceso, pero todos son la base de lo que somos y lo que nos rodea. Tal y como estableció Rudolf Virchow en 1858, omnis cellula e cellula, "toda célula procede de otra célula preexistente por división de esta".

Este mecanismo fundamental subyacente a todos los seres vivos pivota sobre el proceso de duplicación del material genético de la célula parental y su división en las dos células descendientes. La correcta transmisión de la información genética es esencial para la subsistencia y perpetuación de todas las especies. Para llevar a cabo este proceso, la célula parental implementa una serie de cambios bioquímicos y estructurales de forma gradual, que podemos categorizar en cuatro fases consecutivas: G₁, S, G₂ y M (Fig. I1). El primer proceso clave del ciclo se da en la fase S o fase de síntesis del ADN, dónde tiene lugar la duplicación del material genético. El segundo proceso ocurre en la fase M, dónde el ADN que la célula ha duplicado previamente en la fase S se reparte entre las dos células descendientes. Entre estas dos fases principales, se intercalan otras dos fases de crecimiento y regulación de suma importancia, las fases G₁ y G₂. En estas fases intermedias, la célula incrementa su tamaño, regula el ensamblaje de proteínas y estructuras celulares; así como, mediante mecanismos de vigilancia, se asegurará que todo haya ido correctamente en la síntesis del ADN y en su segregación. En los organismos diploides, dentro de la fase M podemos distinguir dos procesos diferenciados: la meiosis y la mitosis. En la meiosis, tras una única fase S, ocurren dos rondas de división celular consecutivas, obteniendo cuatro células haploides. La meiosis es un proceso exclusivo de producción de células germinales, gametos o esporas para la reproducción sexual, siendo la **mitosis** el proceso prevalente en la división celular de organismos eucariotas.





Figura I1. Representación esquemática del ciclo celular en células humanas y ciclo celular en *S. cerevisiae*. Creado con BioRender.

Dentro de la mitosis podemos distinguir 5 fases diferenciadas: A) profase, dónde tiene lugar la condensación de los cromosomas, se separan los dos centrosomas y se inicia el ensamblaje de los microtúbulos del huso acromático. B) prometafase, aquí se produce la desorganización de la envuelta nuclear, los centrosomas se desplazan a los polos opuestos de la célula y los microtúbulos se unen a las cromátidas hermanas. C) metafase, en este momento las cromátidas hermanas se alinean en el plano medio de la célula o placa metafásica. D) anafase, es el momento en el que se produce la separación de las cromátidas hermanas y migran a los polos opuestos de la célula. E) telofase, es el final de la mitosis, los cromosomas se descondensan, se desensambla el huso mitótico y se reorganiza la envuelta nuclear, formándose de nuevo dos núcleos interfásicos idénticos. Tras la mitosis, para que la división celular sea efectiva por completo y cada célula tenga su citoplasma independiente, tiene lugar el proceso de citocinesis. En la citocinesis, se produce la contracción del anillo de actomiosina, la formación de nueva membrana plasmática separando las dos células en el plano medio de la división celular, y por último se produce la separación física entre las dos nuevas células por las hidrolasas que se secretan al medio.

Debido a la gran importancia del ciclo celular en cualquier forma de vida, este proceso está altamente conservado. Todas las células eucariotas mantienen una maquinaria muy similar para llevar a cabo el ciclo celular, pero hay unos organismos que a lo largo de los años han destacado como organismos modelos para estudiar este proceso, **las levaduras**, y en el caso que nos atañe, la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura *S. cerevisiae*, a pesar de ser un organismo unicelular, comparte la gran mayoría de vías metabólicas y reguladoras con el resto de células eucariotas. El genoma completo de esta levadura fue secuenciado y anotado en el año 1998, lo que dio lugar al inicio del empleo de las técnicas ómicas en levadura. Esto, junto con el hecho de que es un organismo que se puede manipular de forma sencilla gracias a su alta tasa de recombinación homóloga, hizo que *S. cerevisiae* fuera uno de los organismos modelos más utilizados en ese momento. Por otro lado, teniendo en cuenta su **fácil crecimiento**, su **rápida división** y su **patrón de crecimiento asimétrico** por gemación (la célula hija nace por gemación de la célula parental), convierten a esta levadura en un modelo especialmente útil para el estudio del ciclo celular. La levadura de gemación muestra marcadores morfológicos que permiten identificar en qué fase del ciclo celular se encuentra la célula en base a la presencia o ausencia de la yema o al tamaño de la misma. Además, se han desarrollado métodos de sincronización muy eficientes para estudiar las diferentes fases del ciclo celular con más detalle. Por estas razones es el **modelo utilizado en esta tesis doctoral** y como norma general, se describirán los procesos del ciclo celular *S. cerevisiae*, aunque se puntualizarán y compararán con los procesos que se dan en otros organismos cuando sea conveniente.

TOUNDON DON

2.1. FASES DEL CICLO CELULAR.

El ciclo celular comienza con la fase G₁ (Gap, intervalo), la célula viene del proceso de citocinesis y acaba de convertirse en una célula nueva e independiente. En la fase G., la célula se prepara para la fase S y determina si las condiciones ambientales y de la propia célula son propicias para iniciar una nueva ronda de división celular. Si las condiciones medioambientales son adecuadas y se ha alcanzado un tamaño mínimo, la célula avanza de forma irreversible por el punto de control del ciclo celular denominado START (o punto de restricción en organismos pluricelulares) y continua hacia la fase S (Hartwell et al., 1974; Fantes, 1977; Baroni et al., 1994 and Tokiwa et al., 1994). En caso negativo, la célula decidirá su destino entre las diferentes opciones de desarrollo: salir del ciclo celular a la fase G_{0} , activar la esporulación (meiosis) o el crecimiento pseudohifal (diferenciación) en el caso de células diploides dependiendo de la severidad de nutrientes y del tipo celular, o en el caso de células haploides activar la conjugación en presencia de feromonas (Cross, 1988; Nash et al., 1988; Freese, Chu, and Freese, 1982). Entre las células que entran en Go tendríamos: células quiescentes (cómo neuronas y células musculares cardiacas) y células senescentes (células envejecidas o deterioradas). Las células quiescentes pueden volver al ciclo celular con la estimulación adecuada; mientras que las células senescentes, se encuentran en el periodo comprendido entre el momento que la célula deja de dividirse hasta que entra en apoptosis o muerte celular programada, proceso por el cual las células deterioradas o dañadas se destruyen (Wei et al., 1993; Laporte et al., 2011; Miles et al., 2013; Wood et al., 2020).

Durante la **fase S** o de síntesis, se produce la **duplicación del material genético** o ADN. El inicio de la replicación del ADN se produce en los orígenes de replicación, que son determinadas secuencias en los cromosomas dónde se forma la horquilla de replicación para iniciar la síntesis de la nueva cromátida (Toone *et al.*, 1977; Kearsey, 1987; Ferguson *et al.*, 1991; Newlon *et al.*, 1993). La nueva hebra sintetizada se mantiene unida a la hebra molde mediante unos anillos proteicos llamados el complejo cohesina (Uhlmann and Nasmyth, 1998). Además, en esta fase en las células de levaduras, se completa la duplicación de los **cuerpos polares del huso** o **SPB** (*Spindle Pole Bodies*, el equivalente a los centrosomas en organismos pluricelulares) (Byers and Goetsch, 1975; Adams and Kilmartin, 1999) y se inicia la gemación o formación en la célula progenitora o "madre" de la yema que dará lugar a la célula descendiente o "hija" (Chant and Pringle, 1995).

A DANDANDANDANDANDANDAN

A continuación, la célula pasa a la **fase G**₂, dónde comprueba que la duplicación del material genético se ha completado correctamente y se prepara para la siguiente fase M. Además, en esta fase se produce el cambio de crecimiento polarizado en la yema al crecimiento isotrópico (en todas las direcciones). Es una fase de crecimiento para la célula madre y la yema (célula hija), igualándose casi el tamaño de ambas.

Por último, llegamos a la fase M, momento en el que la célula pone en marcha un mecanismo de control casi perfecto, para asegurarse la correcta segregación del material genético desde la célula madre a las dos células hijas. En la fase M pueden distinguirse dos grandes eventos: la división nuclear o mitosis propiamente dicha y la división celular o citocinesis (Fig. 12). En la mitosis, la célula distribuye equitativamente las cromátidas hermanas en las dos células hijas, a través de cuatro fases diferentes en S. cerevisiae: profase, metafase, anafase y telofase. A) en la profase, el material genético se condensa y compacta. En S. cerevisiae la mitosis es cerrada, por lo que no se desorganiza la membrana nuclear en ningún momento (en organismos con mitosis abiertas se daría en este punto). B) en la metafase, los dieciséis cromosomas que tiene S. cerevisiae se unen al haz antiparalelo de microtúbulos que emite cada uno de los centros organizadores de microtúbulos o MTOCs (Microtubule <u>Organizing</u> <u>Centers</u>), denominados los cuerpos polares del huso o SPB en levaduras. Cada una de las cromátidas hermanas se une a un haz del huso mitótico proveniente de polos opuestos, alineándose en el plano ecuatorial de la célula o placa metafásica. C) durante la anafase, las cromátidas hermanas viajan a polos opuestos de la placa metafásica por la elongación del huso mitótico, distribuyéndose equitativamente entre las dos células hijas. D) una vez se alcanza la telofase, las cromátidas ya se encuentran distribuidas en su célula respectiva, se descondensan los cromosomas y se desensambla el huso mitótico. Una vez se ha repartido equitativamente el material genético, finaliza la fase M con la **citocinesis**, que es cuando se produce la separación física de las dos células. Se sintetiza el septo primario y los dos septos secundarios que darán lugar a la membrana plasmática y a la pared celular. La célula madre se separa de la hija mediante la contracción de un anillo formado por microfilamentos de actina y miosina, formado alrededor del cuello de gemación, quedando cada célula con un núcleo, un centro organizador de los microtúbulos y aproximadamente el mismo volumen de citoplasma.



Figura I2. Representación de las fases de la mitosis en *S. cerevisiae*. Creado con BioRender.

2.2. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR.

El ciclo celular está altamente regulado y sometido a un estricto control por el sistema de control del ciclo celular (Cell-Cycle Control System) para asegurarse que los eventos de cada una de las fases se den adecuadamente y en el orden temporal correcto (Hartwell et al., 1973). El sistema de control del ciclo celular está altamente conservado entre los organismos eucariotas. El componente principal del sistema de control del ciclo celular son las **proteínas quinasas dependientes de ciclinas** o **Cdk** (*Cyclin-Dependent Kinases*) junto con sus subunidades reguladoras, las ciclinas (Morgan, 1997). La actividad y especificidad por el sustrato de las Cdk varía a lo largo del ciclo celular en función de la ciclina a la que se encuentre unida. Mientras que los niveles de las proteínas Cdk son constantes a lo largo de todo el ciclo celular, la expresión y degradación de las ciclinas fluctúa a lo largo del ciclo, dando lugar a diferentes olas de actividad de los complejos Cdk-ciclina en función de si están presentes o no cada una de las ciclinas en los diferentes momentos del ciclo (Nasmyth, 1996; Nurse, 1990). Esta secuencia de activación/desactivación de los complejos Cdk-ciclina por su unión a las ciclinas, son las señales que permiten a la célula progresar a través de las diferentes fases del ciclo celular, dando lugar a "oleadas" de actividad que se van sucediendo secuencialmente y en algunos casos superponiéndose entre sí. Estas "oleadas" de activación/desactivación van a estar reguladas a su vez por varios sistemas de control independientes y que actúan sobre el núcleo de este proceso, los complejos Cdk-ciclina, tal y como veremos a continuación.



2.2.1. REGULACIÓN DE LOS COMPLEJOS CDK-CICLINA.

Las Cdk son una familia de proteínas serín treonín quinasas, de pequeño tamaño (30 a 40 kDa aprox.), cuya función es fosforilar un gran abanico de sustratos, pero todos estos sustratos tienen en común que son fosforilados en una serina o treonina de una secuencia concreta de aminoácidos, que es reconocida por el centro activo de la Cdk, denominada secuencia consenso de fosforilación (Nasmyth, 1996; Tyson et al., 2001; Tyson et al., 1995). Como norma general, esta secuencia consenso consta de una serina (S) o treonina (T), seguida de un residuo de prolina (P), después un aminoácido cualquiera (X) y luego un aminoácido ácido, como la lisina (K) o arginina (R), quedando la secuencia consenso estructurada de la siguiente manera [S/T*]-P-X-[K/R]. En S. cerevisiae existe una única Cdk llamada Cdc28 o Cdk1 (Cell divison control protein 28), mientras que en otros organismos pluricelulares existen hasta 9 Cdk distintas, aunque sólo 4 (Cdk1, Cdk2, Cdk3 y Cdk4) están directamente involucradas en el ciclo celular (Tabla TI1) (Johnson and Walker, 1999). Las ciclinas son una diversa familia de proteínas cuya característica común es que se unen y activan a las proteínas Cdk (Kobayashi et al., 1992; Lees and Harlow, 1993). Esta unión Cdk-ciclina origina un cambio conformacional en la estructura de la proteína Cdk permitiendo la unión del complejo Cdk-ciclina al sustrato y quedando el centro activo expuesto, para poder llevar a cabo la reacción de fosforilación. Esta unión Cdk-ciclina no sólo controla la actividad enzimática de la quinasa, sino que determina la especificidad por el sustrato del propio complejo Cdkciclina. A la proteína Cdc28 se unen dos tipos de ciclinas a lo largo del ciclo celular: las ciclinas tipo N (Cln1, Cln2 y Cln3), presentes en la fase G₁, y las ciclinas tipo B (Clb1, Clb2, Clb3, Clb4, Clb5, Clb6), presentes entre las fases S y M (Fitch et al., 1992; Spellman et al., 1998; Tyers et al., 1993).

	Fase G1			Fase S			Fase M		
S. cerevisiae	Cdc28			Cdc28		Cdc28			
	Cln1	Cln2	Cln3	Clb5	Clb6	Clb1	Clb2	Clb3	Clb4
Homo sapiens	Cdk4-Cdk6			Cdk2		Cdk1			
	CiclinaD1	CiclinaD2	CiclinaD3	CiclinaE	CiclinaA	CiclinaA	CiclinaB1	CiclinaB2	CiclinaB3

Tabla TI1. Cdks y ciclinas a lo largo del ciclo celular en S. cerevisiae y células humanas.

La actividad de los complejos Cdk-ciclina son el principal componente director del ciclo celular. Debido a su gran importancia en el proceso su actividad está altamente regulada. Una de las principales vías de control es la regulación directa de la formación del propio complejo Cdk-ciclina. Los niveles de las quinasas Cdk son constantes a lo largo de todo el ciclo celular, pero su actividad y especificidad por el sustrato está determinada por cada uno de las distintas ciclinas que forman complejo con ellos y a su vez, los niveles de las ciclinas están controlados mediante su expresión y degradación periódicas a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular (Fig. I3) (Kobayashi *et al.*, 1992; Lees and Harlow, 1993). La función de los complejos Cdk-ciclina es tan importante, que algunos complejos tienen funciones redundantes para asegurarse un control a prueba de fallos sobre la progresión del ciclo celular y en otros casos, se solapan diferenten complejos en el tiempo realizando funciones independientes.

Durante la **fase G**₁, se forman los complejos **Cdc28-Cln1**, **Cdc28-Cln2** y **Cdc28-Cln3** que se encargarán de que la célula avance a lo largo de G₁ poniendo en marcha la maquinaria celular para ejecutar el punto de control *START*. Cuando la célula alcanza un tamaño crítico se activa el complejo Cdc28-Cln3, el cual pone en marcha el programa de transcripción específico de la fase G₁ tardía. En este momento se transcriben las ciclinas *CLN1*, *CLN2*, *CLB5* y *CLB6*, dando lugar a la aparición de la actividad quinasa Cdc28-Cln1, Cdc28-Cln2, pero permaneciendo inactivos los complejos Cdc28-Clb5, Cdc28-Clb6 por la presencia de su inhibidor **Sic1** (Tyers *et al.*, 1993; Schwob and Nasmyth, 1993). La expresión de las ciclinas Cln1 y Cln2 determina el momento exacto para que la célula active los procesos post-START: la gemación, la duplicación del SPB y la replicación del ADN (Tyers, Tokiwa, and Futcher, 1993). El complejo Cdc28-Cln2 es el responsable de iniciar el proceso de formación de la yema (De Bruin, *et al.*, 2004; Dirick and Nasmyth, 1991; Queralt and Igual, 2004).

Durante la transición G_1/S , se transcriben las ciclinas *CLB5* y *CLB6*, pero no es hasta llegar a **fase S** dónde alcanzan su pico de actividad los complejos **Cdc28-Clb5** y **Cdc28-Clb6**. El complejo Cdc28-Cln2 fosforila a Sic1 y Cdh1 induciendo su degradación (Schwob *et al.*, 1994; Verma *et al.*, 1997; Nishizawa *et al.*, 1998). El inhibidor de Cdc28-Clb5/Clb6, Sic1, es eliminado a la vez que se inactiva la degradación de las ciclinas Clb5 y Clb6 mediada por APC^{Cdh1} (Grandin and Reed, 1993; Jackson, Reed, and Haase, 2006; Bhaduri *et al.*, 2015). Al activarse, los complejos Cdc28-Clb5 y Cdc28-Clb6 promueven directamente la replicación del ADN fosforilando diferentes componentes de la maquinaria de replicación (Schwob and Nasmyth, 1993; Stuart and Wittenberg, 1999; DeCesare and Stuart, 2012). La actividad de los complejos Cdc28-Clb5 y Cdc28-Clb6 se mantiene durante toda la fase S, G₂ e inicio de fase M. Los complejos **Cdc28-Clb3** y **Cdc28-Clb4** tienen su pico de actividad en la segunda mitad de la fase S, y regulan la duplicación del cuerpo polar del huso (Fitch *et al.*, 1992). Los complejos Cdk-Clb1-4 se mantienen activos hasta el inicio de la fase M, promoviendo eventos mitóticos tempranos y preparando la célula para el inicio de la mitosis (Epstein and Cross, 1992; Richardson, 1992). El principal paso clave para la entrada en mitosis es la activación del complejo Cdc28-**Clb2.** La ciclina *CLB2* comienza a transcribirse al final de la fase S, mientras que los complejos Cdc28-Clb2 presentan su pico de actividad al inicio de la mitosis (Fitch et al., 1992; Lew and Reed, 1993). La expresión de las ciclinas Clb1, Clb2, Clb3 y Clb4 durante la mitosis, reprime a su vez la expresión del resto de ciclinas evitando la formación de complejos Cdk que no corresponden a esta fase del ciclo celular (Amon et al., 1993; Koch, et al., 1996; Siegmund and Nasmyth,1996). El complejo Cdc28-Clb2 es el motor y principal regulador de la mitosis, es capaz de fosforilarse a sí mismo una vez activo incrementando su actividad y promover las funciones esenciales de esta etapa: la condensación del ADN, el ensamblaje del huso mitótico y la segregación del material genético (Grandin and Reed, 1993; Jin et al., 2008). El complejo Cdc28-Clb2 es el principal regulador siendo suficiente por sí solo para la progresión en mitosis en ausencia de las otras tres ciclinas, Clb1, Clb3 y Clb4 (Fitch et al., 1992). La salida de mitosis y entrada en una nueva fase G, requiere de la inactivación de todos los complejos Cdk mitóticos. Es el último paso necesario y obligatorio que la célula debe cumplir antes de iniciar un nuevo ciclo y que todo vuelva a repetirse.

PANDANDANDANDAN



Figura I3. Representación de los diferentes niveles de actividad de los complejos Cdk-ciclina en el control del ciclo celular en *S. cerevisiae*. Creado con BioRender.

La regulación de la actividad enzimática de los complejo Cdk-ciclina no sólo depende de la activación por su unión a las ciclinas, sino que en muchas ocasiones la propia unión a su ciclina determina una **localización celular** determinada y confiere al complejo Cdk-ciclina **especificidad por el sustrato**. En muchos de los casos, la interacción entre el complejo Cdk-ciclina y el sustrato se hace a través de la unión de la ciclina, mientras que otras veces la unión estabiliza el complejo con el sustrato (Miller and Cross, 2001). En el caso de las ciclinas Cln3, Cln2 y Cln1, está descrito como su distinta distribución subcelular determina la función específica de cada uno de estos complejos Cdk-ciclina (Miller and Cross, 2000; Edgington and Futcher, 2001). Por ejemplo, el complejo Cdc28-Cln3 se encuentra retenido en el retículo endoplásmico hasta que la célula completa satisfactoriamente el punto de control START y viaja al núcleo (Vergés, *et al.*, 2007).

NDANDANDANDAN

Adicionalmente a la regulación por las ciclinas, los complejos Cdk también están regulados por un tercer punto, los **inhibidores de Cdk** o **CKI** (*Cdk inhibitor proteins*). Los inhibidores de Cdk son proteínas que se unen al complejo Cdk-ciclina (tanto a la quinasa como a la ciclina), inhibiendo su actividad. En células humanas el principal inhibidor de Cdk es p27, mientras que en *S. cerevisiae* es **Sic1** (también son CKI Far1 y Cdc16) (Reed *et al.*, 1985). Los niveles de Sic1 aumentan significativamente desde la anafase, dónde Sic1 se une a los complejos Cdc28-Clb para asegurarse que ningún complejo Cdk-ciclina de mitosis o de fase S esté activo durante G_1 (Mendenhall, 1993; Donovan *et al.*, 1994; Schwob *et al.*, 1994; Weinreich *et al.*, 2001). Al final de G_1 , Sic1 se une a los complejos Cdc28-Clb6 manteniendo una baja actividad de los complejos Cdk-Clb, pero permitiendo la actividad de los complejos Cdk-Cln (Lengronne y Schwob, 2002).

¿Cuántas personas hacen falta para cambiar una bombilla? Depende lo difícil que sea cambiarla y lo importante que sea para ti que no haya problemas al cambiarla. No quieres romperla, ni electrocutarte en el proceso, o que de menos luz que antes. Buscas que al cambiarla, cada vez que vuelvas a encender el interruptor, el cien por cien de las veces la luz se encienda (hasta que necesites volver a cambiarla). Con este símil, responderíamos a la necesidad de los tres puntos principales de la regulación de los complejos Cdk. Si nuestra bombilla que da luz son las proteínas Cdk, queremos que siempre de luz de la misma manera, que no se funda, que no dé más luz de la necesaria, ni que nos quedemos a oscuras, por lo que una regulación a diferentes niveles y en algunos casos **redundante** es más que necesaria para que la célula se asegure el correcto funcionamiento de la regulación del ciclo celular. Adicionalmente, en cada fase del ciclo, cada uno de los complejos Cdk-ciclina posee una regulación adicional específica mediante otras quinasas y fosfatasas, de las que hablaremos más en profundidad en los siguientes capítulos. Todos estos componentes crean un sistema de activación de las Cdk como si fueran un interruptor de precisión que permite apagarlas y encenderlas de forma periódica y sin fallos de forma repetida durante cada ciclo celular.


Altamente interconectado con los otros puntos clave de la regulación del ciclo celular se encuentra el proceso de degradación de las proteínas. Este proceso permite a la célula controlar la concentración de las proteínas claves y que necesitan variar sus niveles a lo largo del ciclo o que, una vez desempeñada su función, ya no son necesarias hasta el siguiente ciclo celular. La degradación de las proteínas tiene lugar en el proteasoma, que es un gran complejo proteico, con estructura en forma de barril, dónde las proteínas entran y son destruidas por proteólisis. Al igual que el resto de las regulaciones, este proceso tiene que ser preciso, la célula no puede permitirse destruir proteínas sin control o dejar proteínas defectuosas actuando libremente (Tabla TI2). Para controlar qué proteínas van a ser destruidas y cuales no, la célula marca específicamente las proteínas a destruir mediante el proceso de ubiquitinación, colocando una marca proteica denominada ubiquitina (Galan Haguenauer-Tsapis, 1997; Peng et al., 2003; Vertegaal, 2011; Finley et al., 2012). El proceso de marcaje mediante ubiquitinación lo llevan a cabo las ubiquitín-ligasas y consta de tres pasos: 1) la ubiquitina se une covalentemente y es activada por la enzima E1 (enzima activadora de ubiquitina) en un proceso dependiente de ATP; 2) una vez activa, la ubiquitina se une covalentemente a la enzima conjugativa E2 encargada de transferir la ubiquitina al sustrato (enzima conjugadora transportadora de ubiquitina); y 3) la enzima E3 ligasa cataliza la transferencia de la ubiquitina, unida a la enzima E2, a la proteína objetivo a degradar (Belle et al., 2006; Deshaies and Joazeiro 2009; Finley et al., 2012; Hovsepian et al., 2016).

	Coa	activadores SCI	Coactivadores APC		
S. cerevisiae	Grr1	Cdc4	Met30	Cdc20	Hct1/Cdh1
Sustratos	Cln1,2,3	Sic1	Swe1	Securina, Clb2	Clb2, Cdc20, Cdc5
Vertebrados	SKP2	FBXW7/βTRCP	Ciclina F	Cdc20	Cdh1 A, B, C, D
Sustratos	Ciclina D, p27, p21, Orc1, Cdt1	p53, Ciclina E, MYC, Sgo1, JNK	E2F1, WEE1, Cdh1, E2F1	Securina, NAek2A Ciclina A y B	Ciclina F, Cdc20, PLK1, Aurora A,B

Tabla TI2. Principales coactivadores y sustratos de APC y SCF en vertebrados y S. cerevisiae.

Dentro de la regulación de proteínas del ciclo celular, hay dos **E3 ubiquitín-ligasas** que son clave y actúan en diferentes fases del ciclo celular: el complejo SCF (<u>Skp1/Cullin/F</u>-box) y el complejo promotor de la anafase o ciclosoma APC/C (<u>Anaphase-Promoting</u>)

Complex) (Fig. I4) (Bai et al., 1996; Visintin et al., 1997; Finley et al., 2012). El complejo SCF está compuesto por 4 subunidades: Skp1, Cdc53 (de la familia de las "culinas"), una proteína pequeña Rbx1, con un dominio RING, y una proteína adaptadora que es la que recluta a los sustratos por el dominio de caja F y determina la especificidad por los sustratos de SCF. En general, las proteínas adaptadoras de SCF reconocen sustratos que han sido previamente fosforilados. En muchas ocasiones, son los mismos complejos Cdk-ciclina los responsables de dicha fosforilación, coordinando la proteólisis con el ciclo celular. Las proteínas adaptadoras que intervienen en la regulación del ciclo celular son: SCF^{Grr1} que actúa en la transición G₁/S ubiquitinando las ciclinas tipo Cln (Barral, Jentsch and Mann, 1995; Lanker, Valdivieso and Wittenberg, 1996; Schneider et al., 1998; Berset et al., 2002), SCF^{Cdc4} encargado de ubiquitinar Sic1 promoviendo la entrada en fase S (Feldman et al., 1997; Skowyra et al., 1997; Orlicky et al., 2003); y, SCF^{Met30} en la transición G_2/M marcando para su degradación a la quinasa Swe1, la quinasa responsable de la inhibición al complejo Cdc28-Clb2 (Kaiser et al., 1998; McMillan et al., 2002; Hu, Gan and Aparicio, 2008). El APC es un complejo de 11-13 subunidades que tiene un papel esencial en la transición de metafase a anafase. De forma similar a SCF, APC también contiene una proteína de la familia de las culinas Apc2 y una proteína con dominios RING, Apc11. A diferencia de SCF que reconoce proteínas fosforiladas, el proceso de reconocimiento de sustratos y marcaje por ubiquitinación está regulado por proteínas adaptadoras o coactivadoras que reconocen elementos de secuencia concretos en los sustratos como la caja de destrucción (D box) con la secuencia RXXLXXXXN o la caja KEN (KEN box) con la secuencia KENXXXN (Kramer et al., 2000; Peters, 2006; Thornton et al., 2006; Lu et al., 2014). Las proteínas coactivadoras de APC



Figura I4. Control de los complejos Cdk-ciclina en el ciclo celular de *S. cerevisiae*, a través de su degradación mediada por ubiquitinación por los complejos SCF y APC. Creado con BioRender.

en *S. cerevisiae* son Cdc20 y Cdh1 (*CDC20 Homolog 1*) durante la mitosis y Ama1 en meiosis. Durante la mitosis, APC se une secuencialmente a sus coactivadores: primero, **APC se asocia a Cdc20**, marcando para su degradación al inhibidor de la separasa, la securina (Pds1) permitiendo la segregación de las cromátidas hermanas y regulando así la entrada en anafase (Ciosk *et al.*, 1998; Lim, Goh and Surana, 1998; Peters *et al.*, 2006). Posteriormente, Cdc20 también marca para su degradación a la ciclina Clb2, produciendo la primera onda de degradación de dicha ciclina en la anafase temprana (Lim, Goh and Surana, 1998; Yeong *et al.*, 2000; Wäsch and Cross, 2002). Segundo, **APC se asocia a Cdh1** y marca para su degradación a la ciclina Clb2, la quinasa polo Cdc5, diferentes factores que regulan el huso mitótico y al primer coactivador, Cdc20, promoviendo la salida de mitosis (Visintin, Prinz and Amon, 1997; Schwab, Lutum and Seufert, 1997; Zachariae *et al.*, 1998; Visintin *et al.*, 1998; Visintin *et al.*, 2008).

MOUNDANDANDANDAN

2.2.3. REGULACIÓN DE LOS PUNTOS DE CONTROL DEL CICLO CELULAR.

El sistema de control del ciclo celular, cuyos componentes principales son los complejos Cdk-ciclina, gobierna la progresión en el ciclo celular especialmente en puntos o transiciones claves del ciclo celular. Esos puntos clave para la progresión del ciclo celular se denominan **puntos de control** y aquí la célula se somete a sí misma a una rigurosa inspección de los principales componentes del ciclo celular: tamaño, nutrientes, ensamblaje del huso mitótico correcto, etc. Hay tres puntos clave a lo largo del ciclo celular dónde la célula verifica activamente que todo está correcto para continuar adelante en el ciclo, estos son: el punto de control de G₁/S o START, el punto de control G₂/M, y el punto de control metafase/anafase.

El primer punto de control es el **punto de control de G**₁/S o START (**punto de restricción en células animales**) y tiene lugar al final de la fase G₁. En levaduras, este punto de control establece el **momento de no retorno** de un nuevo ciclo celular. En este punto la célula decide que hacer respecto a diferentes decisiones claves: **A**) si la célula tiene un tamaño suficiente, los nutrientes necesarios y los factores ambientales favorables, tomará la decisión de iniciar una nueva ronda de ciclo celular; **B**) en células haploides, en respuesta a feromonas, iniciará la conjugación con otra célula de locus *MAT* (tipo sexual o *mating*) opuesto al suyo; **C**) en células diploides, comenzar el proceso de esporulación en condiciones de escasez de nutrientes o diferenciarse a pseudohifas en condiciones de privación de nitrógeno; y **D**) si las condiciones no son favorables, detener el ciclo en G₀. En esta etapa las células obtienen un tamaño suficiente para

comprometerse a completar un nuevo ciclo celular manteniendo un tamaño constante en la población, por lo que hay una coordinación exhaustiva entre el tamaño y el ciclo celular. El primer complejo Cdk-ciclina en formarse es Cdc28-Cln3, activador de START (Stuart and Wittenberg, 1995). Al inicio de G₁, Whi5 mantiene inhibidos a los factores de transcripción de G₁/S SBF (<u>SCB Binding Factor</u>) y MBF (<u>MCB Binding Factor</u>) hasta que la célula alcanza un tamaño mínimo (Wijnen, Landman and Futcher, 2002; De Bruin et al., 2004). Una vez alcanzado el tamaño crítico, Cdc28-Cln3 inhibe a Whi5 activando a SBF y MBF, los cuales van a desencadenar la expresión génica específica de G₁/S entre los cuales se encuentran las ciclinas CLN1 y CLN2. De esta forma, aparecen los complejos Cdc28-Cln1 y Cdc28-Cln2, creando un bucle de activación positivo, que pondrán en marcha los procesos pos-START de forma irreversible (Dirick, Böhm and Nasmyth, 1995; Garí et al., 2001; De Bruin et al., 2004; Constanzo et al., 2004; Skotheim et al., 2008; Ferrezuelo et al., 2010; Bristow et al., 2014; Schmoller, et al., 2015). En START, también se controla que haya una suficiente disponibilidad de nutrientes mediante la activación de las vías TOR (Target Of Rapamycin) y RAS que acaban con la inhibición sobre la transcripción de la ciclina Cln3, activando al complejo Cdc28-Cln3 e inhibiendo a Sic1 (inhibidor de los complejos Cdc28-Clb) (Mizunuma et al., 2013; Yahya et al., 2014; Moreno-Torres, Jaquenoud, and De Virgilio, 2015).

A través del **punto de control START**, se determina si el **tamaño celular** es suficiente a través de un **tamaño mínimo crítico** para poder superar la transición G₁/S (Fig. I5) (Johnston et al., 1979). En levaduras de gemación, la célula hija nace con un tamaño menor al de la célula madre y necesita alcanzar el tamaño crítico mínimo para continuar creciendo durante todo el ciclo hasta alcanzar un tamaño similar al de la madre. Sin embargo, la célula madre al haber alcanzado el tamaño crítico en el ciclo anterior, puede iniciar diferentes rondas de ciclo celular y gemación sin necesidad de doblar el tamaño mínimo o de crecer más (Hartwell and Unger, 1977; Lord and Wheals, 1983). Uno de los reguladores más importantes del punto de control START es Whi5. La célula usa a Whi5 para evaluar el incremento de tamaño de la célula y determinar si ha alcanzado el tamaño crítico necesario para superar START. Whi5 es un inhibidor de la transcripción en G_1/S , se sintetiza durante la mitosis del ciclo anterior y a medida que la célula va creciendo, Whi5 va quedando cada vez más diluido hasta que el regulón de G₁/S (más de 200 genes) deja de estar inhibido y se activa su transcripción (Schomoller et al., 2015). Otro de los reguladores importantes en el punto de control START es la ciclina **Cln3**, que actúa como un activador dosis-dependiente de START, ya que existe una relación inversamente proporcional entre el tamaño de la célula y los niveles del complejo Cdc28-Cln3 (Gallego et al., 1997; Wijnen, Landman and Futcher, 2002; Skotheim et al., 2008; Charvin et al., 2010; Schomoller et al., 2015). Otro de los aspectos clave en la regulación del tamaño celular es la tasa de traducción de proteínas, ya que se ha podido establecer una relación directa entre el tamaño celular, la tasa de biogénesis de ribosomas y la tasa de traducción proteica (Bernstein *et al.*, 2007; Moretto *et al.*, 2013). Asimismo, existe una conexión entre la regulación del tamaño celular y la señalización por nutrientes en START, ya que la depleción de nutrientes se ve reflejada en la inhibición de la traducción proteica mediada por la vía TOR y PKA en G_1 (Barbet *et al.*, 1996; Smets *et al.*, 2010).

D



Figura I5. Representación de la regulación del punto de control START en *S. cerevisiae*. Creado con Biorender.

El siguiente punto de control es el **punto de control G**₂/M que aparece tras la replicación del ADN en la fase S. Este punto de control regula que todo esté correcto para iniciar la división nuclear y el cambio de crecimiento apical a crecimiento isotrópico (Fig. I6) (Lew and Reed, 1993). El complejo Cdc28-Clb2 es el principal actor de este punto de control, inicialmente el complejo Cdc28-Clb2 se encuentra inhibido por la fosforilación en la tirosina 19 (Y19) de Cdc28, mediada por la quinasa Swe1 (Booher, Deshaies, and Kirschner, 1993; Hu, Gan, and Aparicio, 2008). En condiciones normales si todo está correcto para entrar en fase M, la proteína Swe1 es marcada para su degradación por el complejo SCF y la fosfatasa PP2A^{Cdc55} (*Phosphatase* 2A) activa a la fosfatasa Mih1 que desfosforila a Cdc28-Clb2 en la tirosina 19, activándola (Yang et al., 2000; Pal, Paraz, and Kellogg, 2008). En este momento, el complejo Cdc28-Clb2 induce el crecimiento isotrópico de la yema y posteriormente la entrada en mitosis. De forma adicional, en este punto la célula también realiza una serie de comprobaciones a través de los mecanismos de vigilancia o *Checkpoints*, los cuales paran o retrasan la progresión del ciclo celular sólo si las condiciones no son adecuadas o si un evento anterior no se ha desarrollado de manera satisfactoria. En la transición G₂/M actúa el **mecanismo de** vigilancia de morfogénesis, que detecta anormalidades en el citoesqueleto de actina y el mecanismo de vigilancia del daño en el ADN o DDC (*DNA Damage Checkpoint*), que se activa en presencia de lesiones en el ADN (Booher, Deshaies and Kirschner, 1993; Sia, Herald and Lew, 1996; Toczyski, Galgoczy and Hartwell, 1997; McMillan, Sia, Lew, 1998; Longhese *et al.*, 1998; Sia, Bardes and Lew, 1998). Ambos checkpoints, paran la entrada a mitosis a través de la estabilización de la securina (Pds1) (Sanchez *et al.*, 1999; Lianga *et al.*, 2013). De esta forma, se detecta cualquier alteración en el ADN antes de que la célula vaya a entrar en el punto crítico del ciclo celular, como es la división del material genético, y se garantiza la estabilidad genómica (Gardner, Putnam and Weinert, 1999).

IPANIPANIPANIPANIPANIPANIPANIPANIP



Figura I6. Regulación del punto de control G₂/M en *S. cerevisiae*. Creado con BioRender.

El punto de control clave durante la mitosis es el **punto de control que regula** la transición metafase-anafase (Fig.17). La transición metafase-anafase viene determinada por la activación del complejo promotor de la anafase/ciclosoma o APC/C^{Cdc20}, el cual ubiquitina a la securina (Pds1) marcándola para su degradación por el proteasoma (Lim, Goh and Surana, 1998; Shirayama *et al.*, 1999; Hilioti *et al.*, 2001). Hasta este momento la proteína separasa (Esp1) se encuentra inhibida por unión a la securina (Ciosk *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 2002). La activación de la separasa promueve la disolución de la unión de las cromátidas hermanas al cortarse la subunidad Scc1 del complejo cohesina por la separasa (Ciosk *et al.*, 1998; Uhlmann, Lottspeich and Nasmyth, 1999). En este punto de control, la célula se asegura que todos los haces de los microtúbulos del huso mitótico se encuentran conectados a los diferentes cinetocoros (estructuras proteicas alrededor del ADN centromérico) de las cromátidas hermanas, los cromosomas se encuentran perfectamente alineados en la placa metafásica y que la tensión en las uniones bipolares entre el huso y el cinetocoro es la correcta. Fallos en el ensamblaje del huso mitótico como la presencia de cinetocoros vacíos de microtúbulos, hacen que la célula reclute la maquinaria del **SAC** (*Spindle Assembly Checkpoint*) dónde ha detectado el fallo, **bloqueando la activación de APC/C**^{Cdc20} y la célula quedará detenida en la transición metafase-anafase. La maquinaria que desempeña la inhibición de Cdc20 en este punto de control se denomina **MCC** (*Mitotic Checkpoint Complex*) y está compuesto por **Mad2, Mad3, Bub3** y el propio **Cdc20** (Sudakin, Chan and Yen, 2001; Herzog *et al.*, 2009; Chao *et al.*, 2012; Di Fiore *et al.*, 2015; Di Fiore *et al.*, 2016;). En el caso de que la célula detecte fallos en la unión de los microtúbulos mitóticos a los cinetocoros, se forma el complejo Mad2-Cdc20 que mantiene secuestrado a Cdc20 en los cinetocoros (Lara-Gonzalez *et al.*, 2012; Musacchio, 2011; Varetti and Musacchio, 2008). Una vez la unión se produce adecuadamente, se satisface el SAC y Cdc20 se libera de su unión a los cinetocoros quedando disponible para unirse y activar a APC (Sudakin, Chan, and Yen, 2001; Nilsson, *et al.*, 2008; Simonetta *et al.*, 2009; Lara-Gonzalez *et al.*, 2012; Hein *et al.*, 2021).



Figura 17. Punto de control transición de metafase-anafase en S. cerevisiae. Creado con Biorender.

En la levadura *S. cerevisiae*, debido a que se divide por gemación y por tanto su **división es asimétrica** (diferente tamaño entre la célula madre y la hija), existe un mecanismo de vigilancia adicional que sólo se activará si detecta algún fallo y que se asegura que el huso mitótico se alinee con el eje que determinan la célula madre y la célula hija durante la anafase. Este mecanismo de vigilancia es el **punto de vigilancia del posicionamiento del huso mitótico** o **SPOC** (*Spindle Position Checkpoint*) y se activa a través de la quinasa Kin4 (D'Aquino *et al.*, 2005; Pereira and Schiebel, 2005; Maekawa *et al.*, 2007). En células con el huso mitótico mal posicionado, Kin4 fosforila a Bfa1 manteniéndola activa. De esta forma el complejo Bfa1-Bub2 inhibe a la vía MEN dando tiempo a la célula a posicionar correctamente el huso mitótico. (Yeh *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Caydasi, *et al.*, 2010).

2.3. LA MITOSIS.

En la mitosis se lleva a cabo el **reparto equitativo de las cromátidas hermanas** entre la célula hija y la madre, así como el resto de contenido celular, con la finalidad de obtener dos células genéticamente idénticas. Clásicamente se distinguen 4 fases dentro de la mitosis de *S. cerevisiae*: profase, metafase, anafase y telofase. En la profase se condensan los cromosomas, en metafase se forma la placa metafásica al alinearse los cromosomas en el centro de la célula, en anafase tiene lugar la segregación del material genético y, por último, en telofase, los cromosomas se vuelven a descondensar y se desensamblan los microtúbulos mitóticos. Al finalizar la mitosis, la célula iniciará la citocinesis para llevar a cabo la separación física de ambas células. Como he comentado en el capítulo "1.2.1. Regulación Cdk-Ciclina", el complejo Cdc28-Clb2 va a ser el motor durante esta fase y su regulación va a marcar los tiempos y el orden de los diferentes eventos que veremos a continuación, con permiso de los otros dos actores importantes de esta fase: la separasa (Esp1) y la fosfatasa Cdc14.

El proceso de **entrada en la mitosis** por parte de la célula no es algo exclusivo de fase M, sino que la célula viene preparando este momento desde fases atrás. Swe1 mantiene la actividad del complejo Cdc28-Clb2 inhibida mediante la fosforilación de Cdc28 en la Y19 hasta la transición G_2/M (Amon *et al.*, 1993; Booher, Deshaies, and Kirschner, 1993) dónde desaparece dicha inhibición y se desencadena un bucle de retroalimentación positiva sobre el propio complejo Cdk1-Clb2 (Hu, Gan, and Aparicio, 2008), aumentando sus niveles de actividad al máximo en un breve periodo de tiempo (Harvey, *et al.*, 2005; Hu, Gan, and Aparicio, 2008; Harvey *et al.*, 2011). En esta fase, los cuerpos polares del huso se separan, generan las fibras de microtúbulos y se conforma el huso mitótico (Nigg and Holland, 2018).

2.3.1. LA TRANSICIÓN METAFASE-ANAFASE.

Una vez la célula alcanza la metafase, los cromosomas ya se encuentran totalmente condensados y unidos al huso mitótico por el cinetocoro. La tensión ejercida por la unión anfitélica (por ambos extremos) del huso mitótico tira de cada cromátida hermana hacia polos opuestos, reorganizando los cromosomas en el plano medio de la división, formando la placa metafásica (Hassler *et al.*, 2019; Robellet *et al.*, 2015). Sin embargo, la tensión ejercida por el huso mitótico no es suficiente por si sola para la separación de las cromátidas hermanas, ya que estas permanecen unidas por un anillo de proteínas denominado el complejo cohesina (Tanaka *et al.*, 2000; Sonoda *et al.*, 2001).

El **complejo cohesina** en *S. cerevisiae* está compuesto por 4 proteínas **Scc1**/Mcd1, **Scc3**, **Smc1**, y **Smc3** (Guacci *et al.*, 1997; Michaelis *et al.*, 1997; Toth *et al.*, 1999), que forman un anillo alrededor del ADN, manteniendo la cohesión de las cromátidas hermanas desde su formación en fase S (Skibbens *et al.*, 1999; Ciosk *et al.*, 2000). Si la célula ha pasado satisfactoriamente el punto de control G_2 /M y se satisface la supervisión del SAC, la proteína Cdc20 estará libre para unirse al APC (Mirchenko and Uhlmann, 2010; Teichner *et al.*, 2011). APC es activado por Cdc28-Clb2 (Yamada *et al.*, 1997; Shteinberg *et al.*, 1999; Rudner and Murray, 2000; Rudner *et al.*, 2000) y al unirse a su **coactivador Cdc20**, se encarga de **marcar para su degradación** mediante ubiquitinación a la **securina (Pds1)** (Funabiki, Kumada and Yanagida, 1996; Cohen-Fix *et al.*, 1996; Ciosk *et al.*, 1999; Sullivan and Morgan, 2007).

Una vez la célula activa a APC^{Cdc20}, al marcarse para su degradación a la securina, llega el momento en el que entra en escena la proteína que define la transición metafase-anafase en la célula, la separasa (Esp1). La separasa es una cisteína proteasa encargada de cortar específicamente la subunidad Scc1 del anillo de cohesina en el momento exacto para que la célula avance a anafase y se puedan separar y distribuir las cromátidas hermanas entre las dos nuevas células (Uhlmann, Lottspeich and Nasmyth, 1999; Uhlmann *et al.*, 2000). La separasa desde antes de la mitosis, permanece inactiva unida a su principal regulador negativo, la securina (Ciosk *et al.*, 1998). Una vez la separasa está activa, mediante su actividad proteolítica corta a Scc1, desestabilizando la unión del complejo cohesina al ADN, permitiendo que la fuerza ejercida por el huso mitótico ahora ya pueda separar a las cromátidas hermanas hacia las dos células hijas. Además, de su actividad proteolítica en la escisión de la subunidad Scc1, la separasa en anafase promueve la elongación del huso mitótico (Sullivan, Lehane and Uhlmann, 2001; Jensen et al., 2001; Stegmeier, Visintin and Amon, 2002; Zhang et al., 2006; Lianga et al., 2018), la activación de la fosfatasa Cdc14 (Sullivan and Uhlmann 2003; Queralt et al., 2006) y la condensación y resolución del ADN ribosómico (ADNr) (Tinker-Kulberg and Morgan 1999; Stegmeier et al., 2002; Sullivan and Uhlmann, 2003; Sullivan et al., 2004; D'Amours, Stegmeier and Amon, 2004). Aunque el principal evento mitótico es la separación de las cromátidas hermanas, para que se lleve a cabo este proceso de forma correcta, multitud de otros eventos están ocurriendo en la célula de forma simultánea. La mayoría de estos eventos implican la activación de distintas proteínas y la fosforilación de diferentes sustratos de la maquinaria de mitosis. En consecuencia, para poder salir de mitosis, la célula tiene que inactivar, revertir o apagar esos eventos mitóticos específicos que ha puesto previamente en marcha.

2.3.2. LA SALIDA DE MITOSIS.

Para devolver a la célula al estado inicial y apagar toda la maquinaria puesta en marcha durante la mitosis, se tienen que desfosforilar todos los sustratos mitóticos previamente fosforilados por la actividad de los complejos Cdk-Clb. Por consiguiente, se necesita una fosfatasa que actúe a partir de ese momento, de forma específica y de manera controlada. Para esta tarea, la célula cuenta con diferentes fosfatasas con actividad en mitosis y aquí es donde entra en juego **Cdc14** y toda la regulación alrededor de esta fosfatasa.

La proteína Cdc14 pertenece a la familia de las fosfatasas con especificidad dual o DUSP (*Dual-Specificity Phosphatases*) que se caracterizan por ser capaces tanto de desfosforilar residuos de tirosina como de serina/treonina. Esta fosfatasa se encuentra altamente conservada desde levaduras hasta humanos (Patterson et al., 2009, Mocciaro and Schiebel, 2010; Bremmer et al., 2012). En levaduras, CDC14 es un gen esencial debido a su papel clave en la salida de mitosis. Cdc14 desfosforila a Swi5, el factor de transcripción de Sic1 (el inhibidor de Cdc28) y al propio inhibidor Sic1, lo que da lugar al aumento de los niveles de Sic1 durante la anafase (Visintin *et al.*, 1998; Jaspersen et al., 1998; Moll et al., 1999). Adicionalmente, Cdc14 desfosforila y activa a Cdh1, al segundo cofactor de APC (Visintin et al., 1998; Jaspersen, Charles and Morgan, 1999), lo que induce la degradación de Clb2 (Bäumer, Braus and Irniger, 2000) y, por tanto, la inactivación del complejo Cdk-Clb2. Como resultado de todas estas acciones, la fosfatasa Cdc14 promueve la salida de mitosis contrarrestando la actividad del complejo Cdc28-Clb2 y desfosforilando los sustratos de dicho complejo (Visintin et al., 1998; Jaspersen et al., 1998; Simpson-Lavy, Zenvirth, and Brandeis, 2015; Power and Hall, 2017; Kataria and Yamano, 2019).

Durante la mayor parte del ciclo celular, Cdc14 se encuentra **secuestrado en el nucleolo, unido a su inhibidor Net1.** Cdc14, Net1, Sir2 y Fob1 forman el complejo de RENT (*REgulator of Nucleolar silencing and Telophase*), cuya función es **reprimir la transcripción del ADNr** mediante la inhibición de la RNA polimerasa II (Visintin, Hwang and Amon, 1999; Shou *et al.*, 1999; Straight *et al.*, 1999; Torres-Rosell *et al.*, 2004; Clemente-Blanco *et al.*, 2011). Al comienzo de la **anafase**, Cdc14 es liberado de su inhibidor Net1 y sale del nucleolo (Shou *et al.*, 1999; Traverso *et al.*, 2001; Azzam *et al.*, 2004; Queralt *et al.*, 2006). Al igual que ocurre con todos los componentes clave del ciclo celular, la activación de la fosfatasa Cdc14 es crucial y debe de hacerse en el momento adecuado y en los pasos establecidos. Para que la activación se produzca correctamente y de forma secuencial, dos vías de regulación actúan conjuntamente sobre la fosfatasa Cdc14: la **vía temprana de liberación de Cdc14 o FEAR** (*cdcEourteen Early Anaphase Release*) y la **vía de salida de mitosis o MEN** (*Mitotic Exit Network*). Tal y como se describe más en detalle en la siguiente sección, la vía **FEAR** actúa en la anafase temprana, cuando todavía hay niveles altos de actividad Cdk-Clb2, promoviendo una primera ronda de liberación de **Cdc14 del nucleolo al núcleo** (Stegmeier *et al.*, 2002; Queralt and Uhlmann, 2008). Posteriormente, la vía **MEN** actúa al final de la anafase, dónde los niveles de la actividad Cdk-Clb2 han disminuido, completando la **liberación total de Cdc14 al citoplasma**, permitiendo que Cdc14 pueda acceder a los sustratos Cdk citosólicos (Jaspersen *et al.*, 1998; Stegmeier *et al.*, 2002; Mohl *et al.*, 2009).

Al inicio de la anafase, la fosforilación de Cdc28-Clb2 y la quinasa Cdc5 sobre Net1 da lugar a que pierda su afinidad por Cdc14, permitiendo a Cdc14 liberarse al núcleo (Visintin et al., 2003; Azzam et al., 2004; Queralt et al., 2006; Rodriguez-Rodriguez et al., 2016). Esta primera activación de Cdc14 por la vía FEAR permite a Cdc14 desfosforilar los sustratos relacionados con: A) la estabilización y elongación del huso mitótico (Pereira et al., 2002; Higuchi and Uhlmann, 2005; Villoria et al., 2017), B) la segregación y resolución del ADNr y los telómeros (D'Amours, Stegmeier, and Amon, 2004; Clemente-Blanco et al., 2009; Clemente-Blanco et al., 2011), C) el reclutamiento de condensinas al ADNr (Sullivan et al., 2004; Manzano-López, and Monje-Casas, 2017), y **D**) la desfosforilación de Cdc15, componente de la vía MEN, que promueve el bucle de retroalimentación positiva para la total activación de Cdc14 (Jaspersen and Morgan, 2000; Lee et al., 2001; Stegmeier, Visintin, Amon, 2002). La primera ronda de activación de Cdc14 por la vía FEAR no es suficiente para activar a APC^{Cdh1} y contrarrestar totalmente la actividad Cdk para salir de mitosis. Por ello, la vía MEN promueve la segunda ronda de liberación de Cdc14 al citoplasma y mantiene activa a la fosfatasa hasta el final de mitosis. La liberación total al citoplasma de Cdc14 da lugar a: A) la activación de Cdh1, promoviendo la degradación de las ciclinas b y Cdc5 por APC^{cdh1} (Visintin *et al.*, 2003; Visintin *et al.*, 2008), **B**) la acumulación de Sic1 e inactivación de Cdc28 (Visintin et al., 1998; Shou et al., 1999) C) el desensamblaje del huso mitótico (Pereira and Schiebel, 2003; Woodruff, Drubin and Barnes, 2010; Pigula, et al., 2014) y **D)** contribuye a la regulación de la citocinesis (Palani *et al.*, 2012; Kuilman *et al.*, 2015; Miller et al., 2015; Tamborrini et al., 2018; Sanchez-Diaz et al., 2012).

EXE 2.3.3. LA VÍA FEAR.

Como he avanzado en el párrafo anterior, la vía FEAR desencadena la liberación de Cdc14 del nucleolo al núcleo (Fig. I8), al comienzo de la anafase, cuando la actividad del complejo Cdc28-Clb2 es todavía elevada. Los componentes que forman la vía FEAR son: Slk19, Fob1, Spo12, Clb2, Cdc5, Zds1, PP2A^{Cdc55}, la separasa (Esp1) y Hit1 (Pereira et al., 2002; Stegmeier, Visintin and Amon, 2002; Yoshida, Asakawa and Toh-e, 2002; Stegmeier *et al.*, 2004; Queralt, *et al.*, 2006; de los Santos-Velázquez *et al.*, 2017). El único componente esencial de la vía FEAR es la separasa, la cual analizo más en profundidad en el capítulo "1.4 La separasa". La separasa interviene en la vía FEAR mediante su función no proteolítica, promoviendo la activación y liberación de Cdc14 del nucleolo (Buonomo et al., 2003; Sullivan and Uhlmann, 2003). La separasa junto a Zds1 y Zds2, inhiben a la fosfatasa **PP2A**^{Cdc55}, que rivaliza al complejo Cdc28-Clb2 en la fosforilación de Net1 (Queralt, et al., 2006; Wang and Ng, 2006). Al inhibirse la fosfatasa PP2A^{Cdc55}, predomina la fosforilación de Cdc28-Clb2 sobre Net1, el cual pierde afinidad por Cdc14 y se produce la liberación de Cdc14 de su unión a Net1 fosforilado (Stegmeier et al., 2002; Azzam et al., 2004; Stegmeier et al., 2004; Queralt, et al., 2006; Tomson et al., 2009; Calabria et al., 2012; Játiva et al., 2019). Por otro lado, la separasa a través de su función proteolítica, regula a la proteína asociada al cinetocoro Slk19 (Sullivan, Lehane and Uhlmann, 2001; Richmond et al., 2013). El corte de la separasa provoca que Slk19 se traslade del cinetocoro a la zona media del huso mitótico, promoviendo su elongación (Sullivan, Lehane and Uhlmann, 2001; Richmond et al., 2013; Lianga et al., 2018; Zhang et al., 2006).

IPANIPANIPANIPANIPANIPANIPAN

Otro de los componentes de la vía FEAR es **Spo12**, una proteína nuclear con actividad bioquímica desconocida, relacionada con la regulación de mitosis y meiosis. Cdc28-Clb2 fosforila a Spo12, lo que da lugar a la disociación de Cdc14 de **Fob1** (Otro componente del complejo de RENT, junto a Net1) (Parkes and Johnston, 1992; Grether and Herskowitz, 1999; Huang and Moazed, 2003; Stegmeier *et al.*, 2004; Tomson *et al.*, 2009). Spo12 se une físicamente a Net1 y estabiliza su unión con Cdc14 (Stegmeier *et al.*, 2004). La quinasa polo **Cdc5** al principio se la consideraba parte de la vía MEN y existía cierta controversia al respecto, pero actualmente está descrito como un componente de las dos vías FEAR y MEN (Hu *et al.*, 2001; Stegmeier *et al.*, 2002 Queralt *et al.*, 2006; Rodriguez-Rodriguez *et al.*, 2016). Cdc5 es activado por Cdc28-Clb2 al inicio de la anafase (Rodriguez-Rodriguez *et al.*, 2016) y participa en la fosforilación de Net1 junto con la propia Cdk, contribuyendo a la liberación de Cdc14 y manteniendo fosforilado a Net1 durante el resto de la anafase (Shou and Deshaies, 2002; Yoshida and Toh-e, 2002; Visintin, Stegmeier, and Amon, 2003; Azzam *et al.*, 2004; Queralt *et al.*, 2006). El último componente incluido en la vía

FEAR es **Hit1**, una pequeña ribonucleoproteína nucleolar, que participa en la activación de Cdc14 y su liberación del nucleolo (de los Santos-Velázquez *et al.*, 2017).

Los mutantes de la vía FEAR, en S. cerevisiae, muestran un fenotipo propio, un retraso de entre un 10 al 20 % en la salida de la mitosis (según la severidad del mutante). El fenotipo FEAR presenta diversos aspectos característicos que lo identifican: en una célula salvaje la liberación de la fosfatasa Cdc14 se produce de forma sincronizada con la elongación del huso mitótico, sin embargo, los mutantes de FEAR presentan un retraso de 5 a 10 min en la liberación de Cdc14 con respecto a la elongación del huso mitótico (Saunders, 2002; Stegmeier, Visintin and Amon, 2002; Sullivan and Uhlmann, 2003; Azzam et al., 2004; Queralt and Uhlmann 2008a; Tomson et al., 2009). Algunos autores señalan que este retraso en la salida de mitosis podría ser debido a que al estar alterada la función de alguno de los componentes de la vía FEAR, no sólo afecta a todas las funciones de la propia vía FEAR, si no que al no producirse correctamente la primera oleada de liberación de Cdc14, al no desfosforilarse a tiempo Cdc15, termina afectando también al inicio de la activación de la vía MEN; sin embargo, otros autores apuntan que este retraso es debido a una separación ineficiente en el reparto del ADNr ya que el retraso en FEAR no afecta a la salida de mitosis ni a la progresión en G₁ (Azzam et al., 2004; Yellman and Roeder 2015).



Figura 18. Liberación de Cdc14 al núcleo regulada por la vía FEAR (cdcFourteen Early Anaphase Release). Creado con BioRender.

2.3.4. LA VÍA MEN.

La vía MEN interviene sobre la regulación de Cdc14 desde la anafase tardía y tiene como eje principal una cascada de señalización de GTPasas, cuyos componentes principales son Cdc5, Bub2-Bfa1, Kin4, Tem1, Lte1, Cdc15, Nud1, Dbf2-Mob1 y Cdc14, (Mah, Jang, and Deshaies, 2001; Visintin and Amon, 2001; Yoshida and Toh-e, 2001). Después de la primera oleada de activación de Cdc14 por la vía FEAR, el complejo Cdc28-Clb2 empieza a perder actividad porque Clb2 empieza a degradarse (Fig. I9) (Lim *et al.*, 1998; Wäsch and Cross, 2002). Hasta este momento, el complejo Bub2-Bfa1 mantiene inactivo a Tem1, una pequeña proteína de la familia de las GTPasas (Bardin et al., 2000; Pereira et al., 2000; Caydasi and Pereira, 2009). Tras la activación de FEAR, Cdc5 fosforila a Bfa1 (Hu et al., 2001; Geymonat et al., 2001 Hu and Elledge, 2002) y la inhibición de la PP2A^{Cdc55} evita su desfosforilación (Baro et al., 2013) inactivando al complejo Bfa1-Bub2, lo cual permite la activación de la vía MEN (Queralt *et al.*, 2006; Baró *et al.*, 2013; Whalen et al., 2018). Adicionalmente, Lte1 promueve la actividad GTPasa de Tem1 cuando el SPB viejo entra en la célula hija, quedándose el SPB nuevo en la célula madre (Bardin et al., 2000; Pereira et al., 2000; Molk et al., 2004). Tem1 activo promueve la activación y localización de la quinasa Cdc15 en los SPBs (Bardin et al., 2000; Jaspersen and Morgan, 2000; Pereira et al., 2000; Whalen et al., 2018; Campbell, Zhou and Amon, 2019).

IPAN PAN PAN PAN PAN PAN PAN PAN PAN



Figura 19. Cambios en las actividades de Cdc28-Clb2 (fosforilación) y Cdc14 (desfosforilación) durante la mitosis. Creado con BioRender.

Además, la fosfatasa Cdc14 activada por FEAR desfosforila a Cdc15, participando a su vez en su activación y creando un bucle positivo de retroalimentación que contribuye a la activación total de Cdc14 (Fig. I10) (Jaspersen and Morgan 2000; König, Maekawa and Schiebel, 2010; Rock and Amon, 2011). Cdc15 a su vez, promueve el reclutamiento y activación de la quinasa **Dbf2** y su regulador **Mob1** (Mah, Jang and Deshaies, 2001). La reactivación de la PP2A^{Cdc55} al final de la anafase y la propia Cdc14 participan en la desfosforilación de Mob1 (Baro *et al.*, 2013), que junto con la disminución de la actividad Cdk1-Clb2 contribuyen a la activación de Mob1 al estar en su estado desfosforilado (Lee, *et al.*, 2001; Mah *et al.*, 2005). Sumado a lo anterior, la quinasa Dbf2-Mob1 fosforila a Cdc14 inhibiendo su señal de localización nuclear o NLS (*Nuclear Localization Sequence*),

quedando localizada en el citoplasma (Mohl et al., 2009). Al localizarse Cdc14 en el citoplasma desfosforila a Cdh1 (Visintin et al., 1998; Jaspersen, Charles and Morgan, 1999) permitiendo su unión a APC. La activación del complejo APC^{Cdh1} promueve la degradación completa de Clb2 al final de mitosis (Bäumer, Braus and Irniger, 2000; Chen et al., 2000; Wasch and Cross, 2002). Cdc14 también desfosforila al factor de transcripción Swi5 (Visintin et al., 1998; Moll et al., 1999), lo que genera que Swi5 se traslade al núcleo induciendo la transcripción de Sic1, lo que aumenta los niveles de Sic1 (inhibidor de Cdc28-Clb2). La degradación de la ciclina Clb2, la inhibición de la quinasa Cdc28 por Sic1 y la desfosforilación de sus sustratos mayoritariamente por Cdc14 provocan una drástica caída de la actividad Cdc28-Clb2 permitiendo a la célula salir de mitosis (Visintin et al., 2008) e inducir la citocinesis (Kuilman et al., 2015). Una vez ha decaído la actividad del complejo Cdc28-Clb2, la vía MEN también interviene en la citocinesis a través de la activación del anillo de actomiosina y la formación del septo (Bardin and Amon, 2001; Yeong et al., 2002; Bembenek et al., 2005; Wolfe and Gould, 2005). Por un lado, cuando la vía MEN libera a Cdc14 al citoplasma, inhibe el crecimiento polarizado y promueve la formación del anillo de actomiosina (Sánchez-Diaz et al., 2012). Por otro lado, la vía MEN mediante la actividad de Cdc14, desfosforila a Lmn1 y Chs2, lo que da lugar a la formación del complejo Cyk3-Lmn1. Cuando Cyk3, Lmn1 y Chs2 se localizan en el cuello de la yema, da comienzo la formación del septo primario (Meitinger et al., 2010; Palani et al., 2012; Miller et al., 2015). Por otro lado, para el correcto desarrollo del anillo de actomiosina, la fosfatasa PP2A^{cdc55} tiene que desfosforilar a la quinasa Chs2, para que así el anillo se cierre de forma simétrica sobre el plano del cuello de la yema (Moyano-Rodríguez et al., 2022).



Figura I10. Activación y liberación de Cdc14 al citoplasma regulado por la vía MEN (Mitotic Exit Network). Creado con BioRender.

Al igual que es indispensable activar en el momento adecuado cada uno de los procesos necesarios para que la célula transcurra por el ciclo celular de forma secuencial y ordenada, también es esencial apagar dichos procesos una vez han concluido su función. Por lo tanto, es de suma importancia que la célula finalice los procesos de la vía MEN. La **inactivación de MEN** se da a través de la propia actividad de Cdc14. Cdc14 desfosforila a Lte1 (Jensen *et al.*, 2002; Seshan Bardin and Amon, 2002), media la disociación de Cdc5 de los centros polares del huso (Hu *et al.*, 2001) y promueve su degradación por APC^{cdh1} (Jensen *et al.*, 2002; Manzoni *et al.*, 2010). Cdc14 también desfosforila a Bfa1, reactivando al complejo Bub2-Bfa1, que retiene e inactiva de nuevo a Tem1 (Hu *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2002 Geymonat *et al.*, 2003). Todos estos procesos contribuyen a la inactivación final de MEN durante la siguiente fase G₁ (Jensen *et al.*, 2002; Seshan, Bardin and Amon, 2005; Botchkarev *et al.*, 2017).

APAN APAN APAN APAN APAN APAN

2.4. LA SEPARASA.

La separasa es una endopeptidasa perteneciente a la familia de las CD clan cisteín proteasas que corta de forma específica la subunidad Rad21/Scc1/Mcd1/Rec8 del complejo cohesina (Uhlmann et al., 2000). En humanos, la separasa se ha encontrado sobreexpresada en diferentes tipos de tumores, considerándola un posible protooncogén, y por tanto, una potencial diana de fármacos antitumorales (Shepard et al., 2007; Meyer et al., 2009; Mukherjee et al., 2011; Mukherjee et al., 2014a; Mukherjee et al., 2014b; Zhang, et al., 2014). La primera referencia sobre la separasa data de una publicación en 1988 (Baum et al., 1988). Años después, en 1992 se registró que la separasa era un importante factor involucrado en la división nuclear (McGrew et al., 1992). En 1996, se identificó en S. pombe Cut1, el homólogo de la separasa y Cut2, el homólogo de la securina en levaduras de fisión (Funabiki *et al.*, 1996). Tiempo después, se consiguió copurificar la separasa junto a la securina en S. cerevisiae (Ciosk et al., 1998) y por fin, en 1999, Frank Uhlmann junto a Friedrich Lottspeich y Kim Nasmyth lograron demostrar que la separación de las cromátidas hermanas está promovida por el corte que realiza la separasa sobre el complejo de la cohesina (Uhlmann, Lottspeich, and Nasmyth, 1999). Un año más tarde, tras el estudio de esta proteína por varios grupos, quedo establecida la separasa como proteasa específica de la subunidad Scc1 del complejo cohesina (Buonomo et al., 2000; Uhlmann et al., 2000; Waizenegger et al., 2000).

La separasa es una proteína multidominio, con un peso molecular desde los 144 kDa en la especie *C. elegans*, **180 kDa en** *S. cerevisiae*, hasta los 244 kDa en *A. thaliana* (Wu

et al., 2010). Pese a las diferencias de masas molecular entre las diferentes especies, los estudios aportados hasta la fecha establecen que la separasa está altamente conservada entre especies (Tabla TI3). En todos los organismos modelo dónde se ha estudiado esta endopeptidasa se conoce que está codificada por un solo gen, excepto en D. melanogaster dónde está codificada por dos genes distintos (Ss2 y THR). En algunas especies, la separasa también presenta diferentes isoformas, como en células humanas. El dominio catalítico en el extremo C-terminal está muy conservado entre las diferentes especies, mientras que el domino regulador, en la parte N-terminal, presenta menor similitud entre las especies analizadas (Uhlmann et al., 2000). En el caso de la separasa, es reseñable su pertenencia al grupo de las CD clan cisteín proteasas porque aparte de estar incluidas algunas proteínas como la clostripaina, la gingipaina R o la legumina, también pertenecen a este grupo la familia de proteínas Caspasa-1, y la separasa tiene un dominio pseudocaspasa en su estructura, aunque no tiene actividad proteolítica (Barrett and Rawlings, 2001). Su distribución dentro de la célula es variada y se ha detectado en la mitocondria (se desconoce función), citoplasma, zona media del huso mitótico y cuerpos polares del huso, pero sobre todo en el núcleo (Jensen et al., 2001; Sickmann et al., 2003; Reinders et al., 2007; Baskerville et al., 2008; Tkach et al., 2012).

ADAMPANDANDANDANDAN

	GEN	PESO kDa	RESIDUOS a.a.	SUTRATOS	GEN SECURINA	OTROS
S. cerevisiae	ESP1	187.44	1630	SCC1, REC8 y SLK19	PDS1	
S. pombe	Cut1	209.434	1828	rec8 y rad21	CUT2	
C. elegans	Sep-1	144.1 2 1	1262	SCC-1/COH-2, COH-1 y 3 y REC-8	LFI1	
A. thaliana	AtESP	244.87	2180	SYN1, 2, 3 y 4		
D. melanogaster	Sse y THR	72.94 y 157.51	634 y 1379	Drad21	РІМ	2 subunida.
M. musculus	Espl1	233.03	2118	SCC1 RAD21		2 isoformas
D. rerio	espl1	240.727	2182	RAD21		3 isoformas
H. sapiens	ESPL1	233.175	2120	SCC1, RAD21 y MEIKIN	PTTG1	2 isoformas
C. albicans	ESP1	184.3	1598	Mcd1, Scc1	Eip1	
Pichia jadinii	ESP1	158.417	1380			
C. smithii	ESP1	237.007	2337			

Tabla TI3. Características de la separasa entre las diferentes especies analizadas en la bibliografía.

La estructura de la separasa en S. cerevisiae está formada por 1.630 aminoácidos, dónde la región alfa-hélice N-terminal constituye los primeros 1.160 aminoácidos y la región C-terminal el resto. Su estructura es similar en parte a la estructura caracterizada de la separasa humana (Fig. I11) (Luo and Tong, 2017; Luo and Tong, 2021). La región helicoidal N-terminal se divide en 4 dominios de secuencias tipo HEAT repetidos (<u>H</u>istidina, Glutamato <u>E</u>, <u>Al</u>anina y <u>Tr</u>eonina) que se doblan desde el primero hacia el cuarto dominio. Se ha descrito que la primera región del dominio I es importante para la interacción de la separasa con el ADN (Sun *et al.*, 2009). El dominio IV es la conexión al dominio de unión a sustrato y al dominio catalítico (Luo and Tong, 2017). El dominio de unión a sustrato o SD (Sustrate Domain) se encuentra justo antes del dominio catalítico, residuos del 1200 a 1380. El SD es la zona por dónde la separasa se une al sustrato y también es una de las zonas de contacto con la securina (la otra está en el CD) (Viadu et al., 2005; Winter, Schmid and Bayliss, 2015). El domino catalítico o CD (Catalitic Domain) es la zona dónde se encuentra el **centro activo** y es la parte de la estructura más conservada entre las diferentes especies (Melesse, Bembenek and Zhulin, 2018). Al CD también se le denomina **dominio proteasa separasa SPD** (Separase Protease Domain) y está compuesto por un dominio pseudoproteasa o PPD (Pseudo Proteasa Domain) y un dominio proteasa activo o APD (Active Protease Domain). En el centro activo está el residuo catalítico Cys1531 que es esencial para la función proteolítica de la separasa, ya que los mutantes *esp1-C1531A* pierden su actividad catalítica (Lin, Lou and Yu, 2016; Luo and Tong, 2017).

IPANIPANIPANIPANIPANIPANIPANIPANIP



Figura I11. A) Estructura tridimensional de la separasa humana (7NJ1) y de *S. cerevisiae* (5U1T). **B)** Representación de los dominios de la separasa. La estrella marca el residuo catalítico y en morado aparece la estructura de la securina, en *S. cerevisiae*. Creado con PyMOL.

2.4.2. LA SECURINA.

La securina (Pds1) es la chaperona que actúa como pseudosustrato y principal regulador de la separasa. La securina (373 aminoácidos) difiere mucho en su secuencia entre los distintos organismos analizados y sólo 100 aminoácidos del extremo C-terminal están conservados entre especies (Csizmok et al., 2008). La securina pertenece al grupo de las proteínas intrínsecamente desordenadas o IDPs (*Intrinsically Disordered Proteins*), que se caracterizan por no presentar una estructura tridimensional bien definida, aunque esto les confiere una gran facilidad de unión al sustrato (Dunker et al., 2000; Tompa, Dosztanyi and Simon, 2006; Ward et al., 2008). La securina al unirse a la separasa muestra una conformación extendida que recorre toda la estructura de la separasa, desde el CD hasta el dominio I del extremo N-terminal. En el extremo C-terminal de la securina se encuentra las secuencias de la caja de destrucción (D box) y la KEN box, dónde APC marca mediante ubiquitinación para su degradación a Pds1 (Cohen-Fix et al., 1996; Funabiki et al., 1996; Yamamoto et al., 1996; Zou et al., 1999). Se dispone de forma antiparalela a la separasa y se encuentra notablemente encajada en la estructura de la separasa, lo que proporciona estabilidad al complejo, siendo la zona cercana al extremo C-terminal (256 a 373) dónde Pds1 interactúa con Esp1, denominado segmento de interacción con la separasa (SIS) (Fig. I12). Parte de la zona de unión de la securina (258 a 269) con la separasa es precisamente el centro activo de la separasa (Cys1531), por lo que bloquea físicamente la unión de cualquier otro sustrato mientras esté unida a la separasa. La disposición de la securina en la unión con la separasa no genera ningún cambio en los 4 dominios de la zona N-terminal, sin embargo, sí que se estima que provoca un cambio conformacional en el SD y CD impidiendo a la separasa cortar a la cohesina. Aunque la estructura de la securina se encuentra pobremente conservada entre especies, los residuos de contacto con la separasa sí se encuentran conservados. La disociación de la securina de la separasa se cree que provoca un cambio conformacional en la estructura de la separasa, sobre todo en el dominio III y CD, ya que este cambio es necesario para que la separasa lleve a cabo la catálisis de la reacción (Luo and Tong, 2017).

El gen que codifica para la proteina securina, pese a la relevancia en la regulación de la separasa, en los únicos organismos en los que es esencial es en levaduras de fisión (*CUT2*) (Funabiki, Kumada and Yanagida, 1996) y en *Drosophila* (PIM) (Stratmann and Lehner, 1996). En **levaduras de gemación no es esencial**, aunque la deleción del gen en los mutantes Δ*pds1* es letal a temperaturas semirestrictivas (28 ^{*o*}C) (Yamamoto *et al.*, 1996; Alexandru *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 2001). Una posible explicación de por qué no es letal la ausencia de la securina en organismos pluricelulares es la redundancia en la regulación de la separasa por diferentes mecanismos, descritos en la sección 1.4.5

Regulación de la separasa (Funabiki, Kumada and Yanagida, 1996; Funabiki et al., 1997 Ciosk *et al.*, 1998; Hellmuth *et al.*, 2015). La securina, respecto a su función e interacción con la separasa es parte de una **regulación** en diferentes fases, se regula **positivamente**: A) mediante fosforilación por el complejo Cdc28-Clb2 en 3 sitios (S277, S292, T304) en el extremo C-terminal de Pds1, que es la zona de la estructura de Pds1 que interacciona directamente con la separasa, lo que promueve la interacción del complejo Esp1-Pds1 y su localización nuclear (Cohen-Fix et al., 1996; Agarwal and Cohen-Fix, 2002); B) Cdc28-Clb2 también fosforila a Pds1 en 2 sitios en el extremo N-terminal (S37 y S71), justo al lado de la secuencia D *box*, dificultando que APC^{Cdc20} pueda poliubiquitinizar y marcar para su degradación a Pds1(Holt *et al.*, 2008); y se regula **negativamente**: **C**) mediante la desfosforilación por PP2A^{Cdc55}, de los 3 sitios fosforilados por Cdc28-Clb2 en el extremo C-terminal, lo que disminuye la afinidad de Pds1 por Esp1 (Khondker et al., 2020); D) la desfosforilación por Cdc14, de los 2 sitios fosforilados por Cdc28-Clb2 en el extremo N-terminal, lo que facilita el marcaje por APC (Holt *et al.*, 2008); y sobre todo, E) mediante el marcaje para su degradación, por el complejo APC^{Cdc20} durante la anafase (Funabiki, Kumada and Yanagida, 1996; Cohen-Fix et al., 1996; Ciosk et al., 1998; Peters et al., 2006) y APC^{Cdh1} durante G₁ (Rudner, Hardwick and Murray, 2000; Pfleger and Kirschner, 2000). La securina, debido a su papel regulador de la separasa, integra multitud de señales de diferentes vías de regulación, como puede ser también en respuesta al daño en el DNA (Wang et al., 2001; Agarwal et al., 2003).

ADVIDANDAN DAN DAN DAN DAN DAN DAN DAN



Figura I12. A) Estructura tridimensional de la zona de inhibición de la securina en morado (298 a 256) en el CD y SD de la separasa (5U1T). La estrella amarilla marca el centro activo y la estrella azul marca el exositio (sitio secundario de interaación) **B)** Segmento de interacción con la separasa o SIS de la securina en morado y las diferentes fosforilaciones descritas de Cdc28-Clb2 sobre la securina: T301, S292 y S277 en la zona SIS de Pds1 y S71 y S37 en la zona de reconocimiento de APC (no presente en la estructura tridimensional, 251 a 1). Creado con PyMOL.

En células humanas, la securina también es conocida como **PTTG1** (*Pituitary Tumor Transforming Gene* 1 *product*) ya que fue identificada por primera vez en células tumorales de la pituitaria de rata (Pei and Melmed, 1997) y clasificado PPTG como un protooncogén en humanos (Jallepalli *et al.*, 2001). PPTG tiene un papel fundamental como supresor de tumores debido a su interacción con uno de los supresores de tumores de más relevancia en células humanas, P53 y con el protooncogén c-myc (Yu *et al.* 2000), así como las quinasas PI3K y MAPK (Wang and Melmed, 2000). La sobreexpresión de PPTG produce la regulación positiva sobre p53 y la apoptosis (Hamid and Kakar, 2004) mientras que, la depleción de PPTG tiene efectos oncogénicos, dependientes de p53 (Bernal *et al.*, 2002). PPTG Además de su función principal como inhibidor de la separasa, también está involucrado en el mantenimiento de la estabilidad intracromosomal (Jallepalli *et al.*, 2001), y se ha detecto alterada en cáncer de pituitaria, colon, pulmones, mama, tiroides, endometrio y del sistema nervioso central (revisado en Salehi *et al.*, 2008).

2.4.3. EL COMPLEJO COHESINA.

El complejo cohesina es un conjunto de proteínas que forman una estructura en forma de anillo de aproximadamente 50nm de largo y 35 nm de diámetro, que conecta y mantiene unidas a las cromátidas hermanas mediante enlaces topológicos, mayoritariamente en la zona pericentromérica de los cromosomas (en levaduras, abarca una región de 15 a 20 kb a cada lado del centrómero) y a lo largo de los cromosomas en los sitios convergentes de transcripción en levadura (Haering et al., 2008; Gligoris et al., 2014; Murayama and Uhlmann, 2015; Gligoris and Löwe, 2016). El núcleo del complejo cohesina presenta cuatro subunidades en levadura: Scc1/Mcd1 (hRad21), Scc3 (hSTAG1/2), Smc1 (hSmc1A), y Smc3 (hSmc3). El anillo de cohesina, está formado por un heterodímero de las subunidades Smc1 y Smc3, formando una estructura en "V" a través de una unión tipo "bisagra". La subunidad Scc1 estabiliza las uniones de los dominios ATPasa de la estructura (Hu et al., 2011) y la subunidad Scc3 (junto a Scc1) se encarga de la unión del complejo al ADN (Murayama and Uhlmann, 2015). Los extremos de cada subunidad, Smc1 y Smc3, presentan una estructura lobular por dónde se une a la subunidad Scc1, junto con Scc3, dando forma esa estructura de anillo (Haering et al., 2002; Anderson et al., 2002; Gruber, Haering and Nasmyth, 2003; Nasmyth and Haering, 2005). Hay otras dos proteínas que interactúan con el extremo C-terminal de Scc1 en el anillo de cohesina, Pds5 (en humanos PSD5A y PDS5B) y Wapl1 (en humanos WAPL), y que son necesarias para el establecimiento de la cohesión del complejo cohesina con la cromatina y para la disociación del complejo de su unión al DNA (Waizenegger et al., 2000; Gandhi, Gillespie and Hirano, 2006; Murayama and Uhlmann, 2014).

El complejo cohesina se une al ADN en la fase G_1 , aunque su unión es dinámica. En levadura, el complejo cohesina se une a la cromatina en cuanto se reinduce la expresión de Scc1 en G_1 (Uhlmann *et al.*, 1999; Ciosk *et al.*, 2000); mientras que en células humanas los complejos de cohesinas se asocian en telofase (Darwiche, Freeman and Strunnikov, 1999; Sumara *et al.*, 2000; Waizenegger *et al.*, 2000). El paso por la fase S es necesaria para el establecimiento de la cohesión tan pronto como se sintetiza la nueva cromátida (Uhlmann and Nasmyth, 1998; Toth *et al.*, 1999; Skibbens *et al.*, 1999; Lengronne *et al.*, 2006). La unión del complejo cohesina a la cromatina lo lleva a cabo el complejo Scc2-Scc4 (en humanos NIPBL-MAU2) (Ciosk *et al.*, 2000; Krantz *et al.*, 2004; Watrin *et al.*, 2006; Seitan *et al.*, 2006; Murayama and Uhlmann, 2014). La acetilación de la subunidad Smc3 por Eco1 (ESCO1 en humanos) durante la fase S contribuye al establecimiento de la cohesión (Schmitz *et al.*, 2007; Rolef Ben-Shahar *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Ünal *et al.*, 2008; Nishiyama *et al.*, 2010); mientras que en células animales también se requiere de la función de una proteína adicional denominada sororina (Rankin, Ayad and Kirschner, 2005; Nishiyama *et al.*, 2008).

La subunidad Scc1 (al igual que Rec8, la proteína equivalente de Scc1 en meiosis) presenta dos sitios consenso de corte por la separasa, en la zona central R180 y R268 en *S. cerevisiae* (en Rec8 R179 y R231) y en Rad21 R172 y R450 (Tomonaga *et al.*, 2000; Hauf, Waizenegger and Peters). Pese a que la principal interacción entre la subunidad Scc1 y separasa se produce a través del sitio de corte principal de Scc1 (R268), en células humanas se ha descrito que Scc1 podría interactuar con separasa en un segundo sitio denominado "motivo LPE", porque está formado por una leucina (L255) una prolina (P256) y un ácido glutámico (E257) (Rosen et al., 2019). Muchas proteasas, así como la separasa, presentan **exositios**, que son regiones distintas del sitio activo por donde también se unen al sustrato en regiones alejadas al sitio de corte del sustrato (el motivo LPE). En S. cerevisiae también está presente un motivo LPE, aunque en este caso sería LPD (L376, P378 y D379) (Jabaiah et al., 2012; Rosen et al., 2019). El exositio para la unión del motivo LPE de Scc1 se encuentra situado en el dominio III de la separasa (muy cercano al dominio CD), y sólo queda accesible después del cambio conformacional que se produce en separasa, originado tras la separación de la securina (la securina también tiene 130LPE en *H. sapiens* y 272VPE en *S. cerevisiae*) (Rosen et al., 2019; Liang et al., 2022). Se ha demostrado que esta segunda unión adicional entre el exositio de la separasa y el motivo LPE de la securina incrementa mucho la eficiencia de corte de la separasa (Rosen et al., 2019). También, se ha observado en células humanas, como la interacción de la separasa con el complejo cohesina es dependiente de la unión de la separasa al ADN. Los autores exponen un modelo en el que separasa se uniría al ADN cercano al complejo cohesina y al propio complejo cohesina de forma dependiente, aunque sin aumentar su capacidad enzimática (Sun et al., 2009).

El desensamblaje del complejo cohesina de las cromátidas en vertebrados se produce en dos fases: en la profase y en la anafase (Fig I13). Durante la prometafase y la profase, mediante la "vía de la profase" (prophase pathway) se produce la eliminación del complejo cohesina de los brazos de los cromosomas, quedando sólo unida en los centrómeros (Losada, Hirano and Hirano, 1998; Waizenegger et al., 2000). En la "vía de la profase" intervienen: la quinasa polo Plk1 (Cdc5 en S. cerevisiae) (Sumara et al., 2002; Lénárt et al., 2007), la proteína Wapl (Wapl1 en S. cerevisiae) (Gandhi, Gillespie and Hirano, 2006; Kueng et al., 2006) y la quinasa Aurora B (Nishiyama et al., 2013). Antes de llegar a metafase, la quinasa polo Plk1 fosforila a la subunidad hSTAG1/2 (Scc3 en S. cerevisiae), desencadenando la disociación del complejo cohesina en los brazos de los cromosomas, sin la necesidad del corte por la separasa (Waizenegger et al., 2000; Hauf et al., 2005). Además, la acción de las proteínas Shugosina y PP2A mantienen a Scc1 desfosforilado y protegido del corte por la separasa en los centrómeros. Sin embargo, en levaduras, no se da la "vía de la profase" y la retirada del complejo cohesina de las cromátidas se hace por igual en toda la estructura de los cromosomas durante la anafase (Fig I13) (Yaakov et al., 2012). En metafase, la quinasa Polo Cdc5 fosforila a la subunidad Scc1 en S175 S268, contribuyendo a aumentar la eficiencia de corte de la separasa sobre la cohesina (Alexandru et al., 2001; Hornig et al., 2002; Hornig and Uhlmann, 2004). Tanto en levaduras como en células humanas, la fuerza ejercida por la tensión del huso mitótico en los cinetocoros en metafase sería suficiente para separar físicamente a las cromátidas hermanas, pero el complejo cohesina las mantiene unidas hasta que se da el corte de la subunidad Scc1 (Charles *et al.*, 1998; Pearson *et al.*, 20011). En la anafase, cuando se activa la separasa, se corta Scc1 permitiendo la separación de las cromátidas hermanas (Uhlmann et al., 2000).

De forma independiente a su función en la cohesión de las cromátidas hermanas, el complejo cohesina también desempeña un papel importante en la formación de los bucles **(loops) intracromosomales** y es responsable de la **compactación de los brazos de los cromosomas** en metafase (Parelho *et al.*, 2008; CLazar-Stefanita *et al.*, 2017; Schalbetter *et al.*, 2017). Recientemente, se ha descrito que una pequeña proporción del total del complejo cohesina sigue anclado y presente en las cromátidas después de su separación en anafase y que cumplen un papel importante en la organización de los centrómeros durante la segregación de las cromátidas hermanas (García-Luis *et al.*, 2022). Otra de las funciones donde la cohesina desarrolla un papel crucial es **preservando la estabilidad genómica** y en la **reparación del daño al ADN**. Esta descrito que la cohesina ayuda a reducir la probabilidad de pérdida de heterocigosis y de grandes reordenamientos cromosomales, preservando la estabilidad genómica de las células (Musio *et a*]; 2005; Sofueva *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2012; Jeppsson *et al.*, 2014). En fase S, el complejo cohesina, al mantener las dos cromátidas unidas durante la

síntesis de DNA limita que pueda presentar daños (Guillou et al., 2010; Caron et al., 2012; Enervald et al., 2013; Thomas-Claudepierre et al., 2013; Bloom, Koshland and Guacci, 2018). Tanto el correcto proceso de unión de la cohesina como la propia cohesina son esenciales para la **supervivencia celular frente a una gran variedad de daño genotóxicos** (Kitagawa et al., 2004; Bauerschmidt et al., 2010; Heidinger-Pauli et al., 2010; Litwin et al., 2018). Debido a la gran importancia del complejo cohesina en el ciclo celular, la alteración en cualquiera de los procesos relacionados con el complejo cohesina ocasionan diferentes alteraciones genéticas que se han englobado bajo el nombre de **cohesinopatías**. Por ejemplo, mutaciones en las subunidades del complejo cohesina (SMC1A, SMC3, RAD21) o sus reguladores (NIPBL/Scc2 o HDAC8) dan lugar al **síndrome de Cornelia de Lange** (Deardorff et al., 2007; García et al., 2021); mutaciones en genes que intervienen en el establecimiento de la cohesión, como ESCO2 (*ECO1* en levaduras), dan lugar al **síndrome de Roberts** (Freeman et al., 1974; Vega et al., 2005); o mutaciones en la Shugosina, la cual interviene en el proceso de disociación del complejo cohesina, da lugar al **síndrome de CAID** (Chetaille et al., 2014; Piché et al., 2019).



Figura I13. Componentes del complejo cohesina y diferencias entre el desensamblaje del complejo cohesina en humanos (sección superior), primero mediante la vía de la profase y después en anafase; y el desensamblaje del complejo cohesina en anafase en *S. cerevisiae* (sección inferior). Creado con BioRender.



2.4.4. FUNCIÓN DE LA SEPARASA.

La separasa es una enzima con actividad proteolítica que cataliza la reacción de hidrólisis de un enlace peptídico, utilizando un tiol como nucleófilo de un residuo de cisteína. El sitio de corte consenso de la separasa es [DES]-x-[DE]-x-x-R. Las principales funciones que lleva a cabo la separasa se pueden clasificar en dos grupos dependiendo de si interviene su actividad catalítica o no. Hasta el momento, los procesos que se conocen que dependen directamente de su actividad catalítica son: el corte de la subunidad kleisina (Scc1 en mitosis y Rec8 en meisois) de la cohesina, el corte de Slk19 y su función en la reparación del daño en el ADN mediada por homología o HDR (Homology-Directed Repair) (Ulhmann et al., 2000; Nagao et al., 2004; McAleenan et al., 2013). Recientemente, se ha descubierto en células humanas, que la proteína del cinetocoro específica de meiosis **Meikin** (*Meiosis-specific <u>Kin</u>etochore protein*) la cual es esencial para la segregación de los cromosomas en meiosis I, también es sustrato de la separasa (Kim et al., 2015; Maier, Lampson and Cheeseman, 2021). Independientemente de su actividad proteasa sobre Scc1, la separasa **regula la salida de mitosis** mediante: 1) la elongación del huso mitótico (Sullivan, Lehane and Uhlmann, 2001; Jensen et al., 2001; Stegmeier, Visintin and Amon, 2002; Zhang et al., 2006; Lianga et al., 2018), 2) la activación de la fosfatasa Cdc14 en la anafase temprana en la vía FEAR mediante la inactivación de la PP2A^{Cdc55} (Sullivan and Uhlmann 2003; Queralt et al., 2006), y 3) en la condensación y resolución del ADN ribosómico (ADNr), (Tinker-Kulberg and Morgan 1999; Stegmeier *et al.*, 2002; Sullivan and Uhlmann, 2003; Sullivan *et al.*, 2004; D'Amours, Stegmeier and Amon, 2004).

EXAMPLE 2.4.5. REGULACIÓN DE LA SEPARASA.

"Un gran poder conlleva una gran responsabilidad". Esta frase asociada al mundo cinematográfico de *Spiderman*, en realidad se remonta al siglo I a.C. y es un gran ejemplo de lo que ocurre con la regulación de la separasa en el ciclo celular. Cuando un proceso y momento tan crucial para la célula se lleva a cabo por una única proteína, como es la separasa, la responsabilidad sobre la continuidad del ciclo celular es enorme. Por este motivo, no es de extrañar que la regulación de la separasa se produzca a diferentes niveles y mediante diferentes mecanismos, a veces incluso redundantes, para asegurar un proceso a prueba de fallos. Este planteamiento se ve incluso reflejado en el aumento en número y complejidad de los procesos reguladores de la separasa a medida que comparamos esta regulación desde organismos unicelulares hacía organismos pluricelulares.

La separasa en G₁ se encuentra mayoritariamente en el citoplasma, pero antes de entrar en fase S se une a la securina tan pronto se sintetiza (Jensen *et al.*, 2001; Nakamura *et* al., 2002; Sun, Yu and Zou, 2006; Holland and Taylor, 2008). Aunque la separasa se va acumulando en el núcleo durante toda la fase G2, sólo alcanza los niveles máximos en el núcleo durante la mitosis (Yamamoto et al., 1996; Jensen et al., 2001). La securina al unirse a separasa tiene una **doble función**, actúa como regulador negativo y positivo. Como regulador negativo para la separasa, A) la securina al unirse a la separasa actúa como un pseudosustrato bloqueando físicamente el centro activo y evitando cualquier posibilidad de que lleve a cabo su función proteolítica sobre ningún sustrato (Luo and Tong, 2017; Luo and Tong, 2021). B) La separasa también se regula negativamente mediante la desfosforilación de los tres sitios fosforilados por Cdc28-Clb2, y podría actuar como una regulación negativa redundante a la inhibición por Pds1 (Lianga et al., 2018). Por otro lado, como regulador positivo, C) la unión entre la separasa y securina tiene un efecto positivo sobre la localización de la separasa. Pese a que la separasa posee una secuencia de localización nuclear o NLS (Nuclear Localization Sequence) RKAQNLALSLLKKKNK en los residuos 798-813 del dominio I, por si sola la NLS no es suficiente para explicar la acumulación de la separasa en mitosis. La unión de la separasa a la securina propicia que el complejo separasa-securina viaje al núcleo (aunque inactivo) (Funabiki et al., 1996; Stratmann and Lehner, 1996; Hornig et al., 2002). D) Cdc28-Clb2 fosforila a la separasa en tres sitios de fosforilación en su parte central (T1014, S1027 y T1034), lo que produce un efecto activador de la separasa en ausencia de Pds1 (Lianga et al., 2018). E) Adicionalmente, la fosforilación de Cdc28-Clb2 a la securina, promueve la unión del complejo separasa-securina y es necesaria para que aumenten los niveles del complejo en metafase (Agarwal and Cohen-Fix, 2002; Holt et al., 2008).

Al comienzo de la anafase, la securina es marcada mediante ubiquitinación por el complejo **APC**^{Cdc20} para su degradación por el proteasoma (Funabiki, Kumada and Yanagida, 1996; Cohen-Fix *et al.*, 1996; Ciosk *et a*l., 1998; Peters *et al.*, 2006). La propia liberación de la separasa de su unión a la securina induce un **cambio conformacional en la estructura** de la separasa (Luo and Tong, 2017), sumado a que ahora el centro activo ya es accesible para el corte de los sustratos, la separasa queda **libre y activa** para realizar sus funciones tanto proteolíticas como no proteolíticas (Irniger *et al.*, 1995; Zachariae *et al.*, 1996; Visintin, Prinz and Amon, 1997; Kramer *et al.*, 1998; Lim, Goh and Surana, 1998). Además, al menos para el caso de la subunidad Scc1 de la cohesina, la fosforilación del sustrato por parte de la quinasa Polo Cdc5 aumenta sustancialmente la eficiencia del corte de la separasa (Alexandru *et al.*, 2001; Hornig *et al.*, 2002; Yaakov *et al.*, 2012).

En células humanas, la separasa tiene tres inhibiciones negativas: la securina, Cdk1-Ciclina B1 y shugoshin2 (Ciosk et al., 1998; Uhlmann et al., 1999; Hornig et al., 2002; Waizenegger et al., 2002; Gorr et al., 2005; McGuinness et al., 2005; Clift, Bizzari, and Marston, 2009; Hellmuth et al., 2020). Se ha visto que el complejo Cdk1-CiclinaB1 inhibe a la separasa de forma **redundante** y **excluyente**, a la regulación ejercida por la securina. El complejo Cdk1-CiclinaB1 fosforila a la separasa en la S1126 y T1346, favoreciendo su unión a la separasa, a través de la propia ciclina B1 (Stemmann et al., 2001). Seguidamente, esta unión Cdk1-CiclinaB1-separasa provoca a su vez, un cambio conformacional en la estructura de la separasa, quedando la separasa autoinhibida. La unión del complejo Cdk1-CiclinaB1 no sólo inhibe a la separasa, sino que también mantiene inhibido y secuestrado al propio complejo Cdk1-CiclinaB1. Este cambio conformacional autoinhibitorio sólo se ha descubierto en la separasa humana y parece ser que evolutivamente sólo estén presentes en la separasa de vertebrados (Gorr et al., 2005; Shindo, Kumada, and Hirota, 2012; Hellmuth et al., 2015). La separasa también es inhibida por el complejo shugoshin2 (SGO2)-MAD2 cuando se activa el SAC. Se piensa que esta inhibición se lleva a cabo mediante el motivo pseudosustrato de SGO2 que bloquearía el centro activo de la separasa (Yu *et al.*, 2021).

ADAMPANDANDANDAN

En cuanto a cómo se produce la **salida de la separasa del núcleo** una vez finalizada la mitosis, **en células humanas** la separasa presenta una **secuencia de exportación nuclear** o **NES** (*Nuclear Export Signal*) y se ha descrito que, una vez terminada la mitosis, la separasa es excluida del núcleo mediante su secuencia NES, dependiente de la proteína transportadora CRM1 y la presencia de la membrana nuclear es suficiente para mantenerla fuera del núcleo (Sun, Yu and Zou, 2006). **En levaduras**, se conoce que la separasa presenta una localización mayoritariamente citoplasmática en G₁, pero se desconoce el mecanismo por el cual la separasa es transportada fuera del núcleo al acabar la mitosis (Kumada *et al.*, 1998; Sun, Yu and Zou, 2006).

Analizando en conjunto todos estos mecanismos de la regulación de la separasa, queda patente la importancia de un correcto control sobre esta proteína clave en el ciclo celular y da sentido a otro factor sumamente importante en la regulación de cualquier proceso que se quiera llevar a cabo de forma controlada y ordenada, como el ciclo celular. Este otro factor de regulación es el **orden** en el que acontecen los mecanismos de regulación sobre la separasa. El orden en el que se van aplicando los diferentes procesos de regulación y control es lo que permite que la célula se convierta en una maquina precisa. Cada uno de estos mecanismos van preparando poco a poco a la separasa para su función final de forma específica y en el **momento adecuado**, realizando la escisión del anillo de cohesina y permitiendo la separación de las cromátidas hermanas sólo en el momento adecuado de la anafase. Sak1 (<u>Snf1-Activating Kinase 1</u>) es la **principal serina/treonina quinasa activadora de la proteína Snf1** (Sucrose Non-Fermenting 1) en S. cerevisiae. Previamente al gen *YER129W* se le conocía con el nombre de *PAK1* (<u>Polymerase Alpha Kinase 1</u>), ya que se identificó por primera vez como un mutante supresor de la cepa termosensible *cdc17-1* de la polimerasa I o *POL1* (también identificada como *CDC17* o *HPR3*) (Hovland *et al.*, 1997). Más tarde, debido a que la familia de quinasas activadoras de p21 se denominaba también PAK (<u>p21-Activated Kinases</u>) y su denominación se usaba más frecuentemente, para evitar mayores confusiones, cuando se descubrió la relación de Pak1 en la activación de la quinasa Snf1, pasó a denominarse oficialmente Sak1 (Nath *et al.*, 2003).

Sak1 es la principal quinasa que activa a la proteína **Snf1**, pero no es la única. En S. cerevisiae hay otras dos quinasas muy relacionadas a Sak1 que también fosforilan a Snf1, Tos3 y Elm1. Sak1, Tos3 y Elm1 además de presentar una función compartida, guardan gran similitud en ciertas partes de su estructura, como el dominio quinasa, dónde comparten casi un 60% de su secuencia (Rubenstein et al., 2006). Sin embargo, difieren en sus extremos N-terminal y C-terminal (Sutherland et al., 2003; Hong et al., 2003). Aunque las tres quinasas son capaces de activar a Snf1, no son intercambiables entre sí, cada una presenta una especialización a la hora de la activación de Snf1 dependiendo de las condiciones celulares. Por ejemplo, sólo Sak1 y Elm1 son capaces de hacer frente al estrés por ausencia de inositol (Schmidt and McCartney, 2000; McCartney, Rubenstein, and Schmidt, 2005), mientras que Sak1 es la quinasa principal frente al estrés salino (Hong and Carlson, 2007) o Tos3 tiene un papel clave en la adaptación tras un choque térmico (Wang et al., 2022). Algunos autores especulan con la posibilidad de que estas diferencias entre Sak1, Tos3 y Elm1, se puedan atribuir a las diferencias que presentan estas proteínas en su estructura fuera del dominio quinasa (Yang et al., 2021; Wang et al., 2022), como en el caso de Elm1, dónde su región C-terminal no es necesaria para la regulación sobre Snf1, pero es esencial para su función en morfogénesis (Rubenstein et al., 2006). Otro rasgo característico que comparten las tres quinasas activadoras de Snf1 es que no poseen el residuo conservado de treonina del bucle de activación, característico de las proteínas quinasas. Esto implica que también su regulación se llevará a cabo de una forma diferente al resto de proteínas quinasas (Nolen, Taylor and Ghosh, 2004; McCartney, Rubenstein and Schmidt, 2006). Pese a que se conoce su dominio quinasa, del residuo 131 al 450, **el centro activo de Sak1**, el residuo catalítico **D277** (Nath, McCartney and Schmidt, 2003), y el residuo de fosforilación del sustrato Snf1 (T210) (Estruch et al., 1992; McCartney and Schmidt 2001; Nath, McCartney and Schmidt, 2003; Elbing et al., 2006), la falta de otros sustratos conocidos de Sak1 dificulta establecer con seguridad una secuencia consenso de fosforilación para la identificación de nuevos posibles sustratos.

En levaduras, S. cerevisiae usa la glucosa como fuente principal de carbono, siempre que esté disponible, pero es capaz de utilizar otros azúcares como fuentes alternativas de carbono para su metabolismo (Crabtree, 1929; Noor et al., 2003). Cuando la célula se encuentra en situación de niveles limitantes de glucosa, la vía Sak1/Snf1 actúa como sensor de falta de nutrientes y a través de la cascada de señalización, activa o reprime determinados factores de transcripción que paran la maquinaria para utilizar la glucosa y ponen en marcha los mecanismos necesario para poder usas fuentes alternativas de carbono, como la sucrosa, galactosa o el etanol (Fig. I13) (Wilson, Hawley and Hardie, 1996; Jiang and Carlson, 1996; Gancedo, 1998; Carlson, 1999; McCartney and Schmidt, 2001). De igual forma que ocurre con LKB1 en humanos, como se describe a continuación, la vía Sak1/Snf1 actúa como regulador principal de la mayoría de las situaciones de estrés en la célula: estrés por sodio (Thompson-Jaeger et al., 1991; Alepuz, Cunningham and Estruch. 1997; Portillo, Mulet and Serrano, 2005), altas temperaturas (Thompson-Jaeger et al., 1991), pH alcalino (Platara et al., 2006), estrés oxidativo (Hedbacker, Hong, and Carlson, 2004) y estrés genotóxico (Dubacq, Chevalier and Mann, 2004; Hong and Carlson, 2007).



Figura I13. Representación de la vía de señalización de Sak1/Snf1 bajo condiocines de glucosa abundante y baja gluocosa en *S. cerevisiae*. Creado con BioRender.

Sak1 es la única de las tres quinasas activadoras de Snf1 que forma un complejo estable con Snf1, es la principal vía de fosforilación de la **T210** de Snf1 y aunque la vía Sak1/Snf1 está bien estudiada, se desconoce la regulación aguas arriba que hace que se active Sak1. La posibilidad de que Sak1 sea el primero paso de una cascada de señalización, capaz de responder a una variedad tan dispar de estímulos y respuestas, implica que Sak1 tiene que estar sujeto a una amplia regulación, que le permita discernir como actuar en cada momento (Hedbacker, Hong and Carlson, 2004; McCartney, Rubenstein and Schmidt, 2005; Elbing, McCartney and Schmidt, 2006). En un estudio para la identificación de nuevos sustratos de Cdc28, se identificó que el complejo Cdc28-Clb2 fosforila in vivo a Sak1 en dos sitios consenso, S_{36} PTK y S_{966} PQK, pero se desconoce las implicaciones que tienen estas fosforilaciones en la función y regulación de Sak1 (Holt *et al.* 2009; Zimmermann *et al.*, 2017).

IPANIPANIPANIPANIPANIPANIPAN

En humanos, el gen STK11 codifica para LKB1 (Liver Kinase B1), la proteína ortóloga de Sak1 que actúa sobre la quinasa dependiente de AMP o AMPK (AMP-Activated Protein Kinase), la proteína ortóloga de Snf1. LKB1 forma un complejo junto a las proteínas Mo25 y STRAD que actúan como sensor de la célula, activando y fosforilando a AMPK en la T172 en respuesta a diferentes tipos de estrés, pero principalmente por falta de nutrientes (Boudeau et al., 2003; Lizcano et al., 2004). AMPK es el principal regulador homeostático de la célula y una vez está fosforilada, inicia una cascada de señalización para activar o reprimir diferentes factores de transcripción, que permiten a la célula adaptarse y hacer frente a los diferentes tipos de estrés (Hardie, Carling and Carlson, 1998; Woods et al., 2003; Lizcano et al., 2004; Shaw et al., 2004; Shackelford and Shaw, 2010; Burkewitz et al., 2014). Mediante un completo estudio ómico se evidenció que la función de Snf1 es fisiológicamente similar a la función de AMPK de mamíferos (Usaite et al., 2009). El gen STK11 fue descrito por primera vez como el gen responsable del síndrome Peutz-Jeghers (Hemminki *et al.*, 1998; Jenne *et al.*, 1998; Mehenni *et al.*, 1998) y posteriormente se le identificó como quinasa **supresora de tumores** en diferentes tipos de neoplasias malignas como el cáncer de pulmón (Sánchez-Céspedes *et al.*, 2002; Fernández et al., 2004; Rodríguez-Nieto and Sánchez-Céspedes, 2009), cáncer colorrectal (Dong et al., 1998; Nakagawaet et al., 1999; Sánchez-Céspedes et al., 2002), cáncer de páncreas (Su et al., 1999; Sato et al., 2001) y cáncer de cuello uterino (Avizienyte et al., 1999; Kuragaki et al., 2003).

De forma paralela a los hallazgos en la implicación de LKB1 en los diferentes tipos de cáncer, se descubrieron nuevas funciones que implicaban a LKB1 en la regulación del metabolismo (Gwinn *et al.*, 2008; Shackelford *et al.*, 2009), proliferación (Corradetti *et al.*, 2004, Inoki *et al.*, 2006) polaridad (Baas *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Zheng and

Cantley, 2007) y migración celular (Granot *et al.*, 2009; Boehlke *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2017). En 2023, aún sigue siendo una proteína clave en el estudio de diferentes tumores y vías de regulación, así como diana para nuevos fármacos antitumorales (Wei *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2005; Jansen *et al.*, 2009; Wingo *et al.*, 2009; Gan *et al.*, 2010; Nakada, Saunders and Morriso, 2010; Lai *et al.*, 2012; Dogliotti *et al.*, 2017; Hermanova *et al.*, 2020). El amplio abanico de funciones que realiza la quinasa LKB1 en humanos (metabolismo, proliferación y crecimiento, polaridad celular, migración celular) la han situado como una de las quinasas reguladoras "maestras" en la célula. Esto nos hace pensar, que Sak1 podría estar involucrado en muchas más funciones aún no descritas.

DAVDAVDAVDA







OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es identificar nuevas funciones o nuevos mecanismos de regulación de la separasa para profundizar en el conocimiento a nivel molecular de la progresión tumoral, la proliferación celular y el correcto crecimiento de todos los organismos.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- 1. Estudio y validación de mutantes supresores de la separasa.
 - 1.1. Validación de las mutaciones supresoras de la separasa.
 - 1.2. Caracterización del mutante supresor *esp1-2 pah1-C549T*.
 - 1.3. Caracterización del mutante supresor *esp1-2 Sak1-G150A*.
- 2. Investigar la relación funcional entre Sak1 y la separasa durante la mitosis.
 - 2.1. Estudiar las interacciones genéticas entre SAK1 y ESP1.
 - 2.2. Caracterizar el fenotipo supresor durante la mitosis.
 - 2.3. Investigar la regulación de la separasa mediada por Sak1.


METODOLOGÍA



3.1. PLÁSMIDOS Y CEPAS.



Los plásmidos usados en este trabajo se detallan en la tabla M1. Dichos plásmidos se amplificaron por transformación de células competentes de *Escherichia coli (E. coli)* DH5α [Thermo Fisher[™]] en todos los casos. Los transformantes obtenidos se seleccionaron en medio LB (*Luria-Bertani*): 0,5% extracto levadura, 1% triptona y 1%NaCl [ForMedium[™]], suplementado con 50 µg/ml de ampicilina [ForMedium[™]]. La temperatura de crecimiento para los cultivos de *E. coli* fue de 37 °C. La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante mediante el kit *NucleoSpin® Plasmid* [Macherey-Nagel[™]].

Los plásmidos p*SAK1*-TAP y p*GAL1-SAK1*-TAP fueron construidos mediante ensamblaje de secuencias de productos de PCR usando el kit *NEBuilder*[®] *HiFi assembly* [New England Bio-labs[™]]. Los productos de PCR para el ensamblaje de secuencias fueron amplificados mediante la ADN polimerasa *NZYProof*[®] [NZYTech[™]]. Para la obtención del plásmido p*GAL1-SAK1*-TAP la secuencia de ADN del vector YIp204*GAL1* fue cortada con la enzima de restricción BamHI y ensamblada con el fragmento de ADN amplificado correspondiente al locus de *SAK1*, mediante *HiFi assembly* [New England Biolabs[™]]

VECTOR		PLÁSMIDO		ORIGEN
pRS426		2µ pSAK1-TAP	_	Martin C. Schmidt
YIp204GAL1	_	GAL1-SAK1-TAP	_	Este trabajo
YEplac181		GAL1-PAH1		Symenon Siniossoglou
YEplac181		GAL1-PAH1-S705D,S110A, S114A,S168A,S602A,T723A, S744A,S748A		Symenon Siniossoglou
YEplac181	_	GAL1-PAH1-D398A,D400A	—	Symenon Siniossoglou
YIp22	_	MET3-CDC20	_	Frank Ulhmann
YIp22		GAL1-CDC20		Frank Ulhmann

TABLA M1. Tabla con los plásmidos utilizados en este trabajo.



J

Todas las cepas de levadura que se utilizaron en este trabajo derivan del fondo genético W303 y su descripción se presenta en la tabla M2. Los medios de cultivo usados durante este trabajo fueron el medio rico YP (1% extracto de levadura, 2% peptona) [ForMedium[™]], suplementado con la correspondiente fuente de carbono YPD (2% glucosa), YPRAF (2% rafinosa), YPGAL (2% galactosa y 2% rafinosa) [ForMedium[™]]; o medio mínimo YNB (0,67% *yeast nitrogen base*, 40 µg/ml de aminoácidos y nucleótidos necesarios para la selección de auxotrofías y la correspondiente fuente de carbono al 2%) [ForMedium[™]]. Las cepas con resistencia al antibiótico geneticina (sulfato G418) se cultivaron en placas YPD suplementando con 200mg/l de G418 [ForMedium[™]].

CEPA	GENOTIPO
W303 —	MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 psi+
W303 —	MATα leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 psi+
E1052 —	MATα Δsak1::LEU2
E1393 —	MATa esp1-2 Δsak1::TRP1
E1538 —	<i>ΜΑΤα SAK1-</i> 6HA:: <i>HIS5</i>
E1644 —	MATa esp1-2 Δsak1::TRP1 GAL1-CDC20::LEU2
E1645 —	MATa esp1-2 NET1-mCherry::HIS3 CDC14-EGFP::HIS3 SPC42-EYFP::HIS3 GAL1-CDC20::LEU2
E1655 —	MATα Δsak1::LEU2 GAL1-CDC20::URA3
E1668 —	MATa pSAK1-TAP
E1669 —	MATa esp1-2 pSAK1-TAP
E1670 —	MATa pGAL1-PAH1
E1671 —	MATa esp1-2 pGAL1-PAH1
E1672 —	MATa pSAK1-TAP GAL1-CDC20::LEU2
E1673 —	MATa esp1-2 pSAK1-TAP GAL1-CDC20::LEU2
E1674 —	MATa pGAL1-PAH MET3-CDC20::TRP1
E1675 —	MATa esp1-2 pGAL1-PAH1::LEU2 MET3-CDC20::TRP1
E1676 —	MATa GAL1-PAH1-7A::LEU2
E1677 —	MATa esp1-2 GAL1-7A-PAH1::LEU2
E1678 —	MATa GAL1-PAH1-D398A-D400A::LEU2
E1679 —	MATa esp1-2 GAL1-PAH1-D398A-D400A::LEU2
E1680 —	MATa ESP1-HA6::HIS3 MET3-CDC20::TRP1
E1681 —	MATa ESP1-HA6::HIS3 YCplac111
E1682 —	MATa ESP1-HA6::HIS3 GAL1-PAH1-ProtA::LEU MET3-CDC20::TRP1

CEPA	GENOTIPO
E1683 —	MATa ESP1-6HA::HIS3 YCplac33 GAL1-CDC20::LEU2
E1684 —	MATa ESP1-6HA::HIS3 pSAK1-TAP GAL-CDC20::LEU2
E1685 —	MATα MET3-Cdc20::LEU2 YCplac33
E1686 —	MATa esp1-2 GAL1-CDC20::LEU2
E1687 —	Mata ESP1-6HA::HIS3 SAK1-9PK::TRP1 GAL-CDC20::LEU2
E1692 —	MATα esp1-2 sak1-G150A
E1693 —	MATa esp1-2 pah1-E183K
E1694 —	MATa esp1-2 sak1-G150A GAL1-CDC20::LEU2
E1696 —	MATa YCplac111
E1697 —	MATa esp1-2 YCplac111
E1698 —	MATα sak1-G150A
E1699 —	MATα pah1-E183K
E1700 —	MATα sak1-G150A GAL1-CDC20::LEU2
E1711 —	MATα NET1-mCherry::HIS3 CDC14-EGFP::HIS3 SPC42-EYFP::HIS3 Δsak1::TRP1
E1712 —	MATa NET1-mCherry::HIS3 CDC14-EGFP::HIS3 SPC42-EYFP::HIS3 Asak1::TRP1 GAL1-CDC20::LEU2
E1713 —	MATa esp1-2 NET1-mCherry::HIS3 CDC14-EGFP::HIS3 SPC42-EYFP::HIS3 Asak1::TRP1
E1714 —	MATa esp1-2 NET1-mCherry::HIS3 CDC14-EGFP::HIS3 SPC42-EYFP::HIS3 Asak1::TRP1 GAL1-CDC20::LEU2
E1719 —	MATa YCplac33 GAL1-CDC20::LEU2
E1720 —	MATα esp1-2 sak1-G150A GAL1-CDC20::LEU2
E1723 —	MATα esp1-2 sak1-G150A-9PK::TRP1 GAL1-CDC20::LEU2
E1724 —	MATa esp1-2 sak1-G150A-6PK::TRP1 GAL1-CDC20::LEU2
E1734 —	MATa esp1-2 sak1-9PK::TRP1 GAL1-CDC20::LEU2
E1735 —	MATα sak1-G150A-9PK::TRP1 GAL1-CDC20::LEU2
E1737 —	MATα NET1-mCherry::HIS3 CDC14-EGFP::HIS3 SPC42-EYFP::HIS3 GAL1-CDC20::LEU2
E1778 —	MATα Δsak1::LEU2 cdc15-2
E1779 —	MATa GAL1-SAK1-TAP::TRP1
E1780 —	MATa Δsak1::TRP1
E1785 —	MATa GAL1-SAK1-TAP::TRP1 MET3-CDC20::LEU2
E1790 —	MATa esp1-2 GAL1-SAK1-TAP::TRP1
E1791 —	MATα esp1-2 GAL1-SAK1-TAP::TRP1
E1792 —	MATα GAL1-SAK1-TAP::TRP1
E1793 —	MATa esp1-2 GAL1-SAK1-TAP::TRP1 MET3-CDC20::LEU2
E1807 —	MATa Δpah1::URA3 CDC14-9PK-KanMX4

E1808 — *MATα Δpah1::URA3 CDC14-*9PK-*KanMX4*

METODOLOGÍA

CEPA	GENOTIPO
E1809 —	MATa cdc15-2 GAL1-SAK1-TAP::TRP1
E1810 —	MATα cdc15-2 GAL1-SAK1-TAP::TRP1
E1811 —	MATa CDC14-6HA::HIS3 GAL1-Flag-ESP1-TRP1 MET3-HA3-CDC20::LEU2 pSAK1-TAP
E1819 —	MATα GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6)
E1820 —	MATa GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) Δsak1::LEU2
E1833 —	MATα pah1-E183K GAL1-CDC20::LEU2
E1836 —	MATα cdc14-1 Δsak1::TRP1
E1837 —	MATa sak1-G150A-6PK::TRP1 ESP1-HA6::HIS3 GAL1-CDC20::LEU2
E1842 —	MATα cdc14-1 sak1-G150A NET1-mCherry::HIS3 SPC42-EYFP::HIS3
E1843 —	MATa cdc14-1 sak1-G150A NET1-mCherry::HIS3 SPC42-EYFP::HIS3 GAL1-CDC20::LEU2
E1844 —	MATa cdc14-1 sak1-G150A
E1847 —	MATa esp1-2 pah1-E183K GAL1-CDC20::LEU2
E1852 —	MATα SPC42-EGFP::URA3 HOF1-mCherry::HIS3 MET3-Cdc20::LEU2
E1858 —	MATa esp1-2 Δpah1::URA3
E1859 —	MATα esp1-2 Δpah1::URA3
E1860 —	MATa Δpah1::URA3 NET1-mCherry::HIS3 CDC14-EGFP::HIS3 SPC42-EYFP::HIS3
E1861 —	MATa Δpah1::URA3 NET1-mCherry::HIS3 CDC14-EGFP::HIS3
E1862 —	MAT cdc14-1 sak1-G150A GAL1-CDC20::URA3
E1863 —	MATα cdc14-1 sak1-G150A-9PK::TRP1
E1864 —	MATα cdc14-1 sak1-G150A-9PK::TRP1 GAL1-CDC20::LEU2
E1865 —	MATa cdc15-2 sak1-G150A-9PK::TRP1
E1866 —	MATa cdc15-2 sak1-G150A-9PK::TRP1 GAL1-CDC20::LEU2
E1867 —	MATα cdc14-1 Δsak1::TRP1 GAL1-CDC20::URA3
E1872 —	MATa esp1-2 Δpah1::URA3 GAL1-CDC20 ::TRP1
E1873 —	MATa Δpah1::URA3 NET1-mCherry::HIS3 CDC14-EGFP::HIS3 SPC42-EYFP::HIS3 GAL1-CDC20::TRP1
E1916 —	MATa esp1-2 MET3-CDC20::LEU2
E1917 —	MATα sak1-G150A MET3-CDC20::URA3
E1918 —	MATα sak1-G150A MET3-CDC20::URA3
E1919 —	MATa esp1-2 sak1-G150A MET-CDC20::URA3
E1922 —	MATa ESP1-6HA::HIS3 SAK1-6PK::TRP1
E1923 —	MATα Δsak1::LEU2 SCC1-6HA::HIS3
E1924 —	MATα sak1-G150A SCC1-6HA::HIS3
E1925 —	MATa esp1-2 sak1-G150A SCC1-6HA::HIS3
E1926 —	MATa SCC1-6HA::HIS3 MET3-HA3-CDC20::LEU2

CEPA	GENOTIPO
E1927 —	MATα esp1-2 SCC1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::LEU2
E1928 —	MATα Δsak1::LEU2 SCC1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA
E1929 —	MATα sak1-G150A SCC1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA3
E1930 —	MATa esp1-2 sak1-G150A SCC1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA3
E1934 —	MATa PDS1-6HA::HIS3 MET3-HA3-CDC20::LEU2
E1935 —	MATα esp1-2 PDS1-6HA::HIS3 MET3-Cdc20::LEU2
E1936 —	MATα Δsak1::LEU2 PDS1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA3
E1937 —	MATα sak1-G150A PDS1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA3
E1938 —	MATa esp1-2 sak1-G150A PDS1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA3
E1939 —	MATa GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) MET3-HA3-CDC20::TRP1
E1940 —	MATa GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) Δsak1::LEU2 MET3-HA3-CDC20::TRP1
E1941 —	MATα Δsak1::LEU2 ESP1-6HA::HIS3
E1944 —	MATa esp1-2-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA3
E1945 —	MATα Δsak1::LEU2 ESP1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA3
E1946 —	ΜΑΤα ESP1-6HA::HIS3 sak1-G150A MET3-CDC20::URA3
E1947 —	MATa esp1-2-6HA::HIS3 sak1-G150A MET3-CDC20::URA3
E1955 —	MATa ESP1-6HA::HIS3 SAK1-6PK::TRP1 MET3-CDC20::URA3
E1962 —	MATa GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) Δsak1::LEU2 MET3-HA3-CDC20::TRP1 SCC1-6PK::HIS
E1964 —	MATα ESP1-6HA::HIS3 sak1-G150A-6PK::TRP MET3-CDC20::URA3
E1968 —	MATa Δpep4::HIS3 GAL1-FLAG-ESP1-CBP-TEV-CBD::LEU2MET3-CDC20::URA3
E1969 —	MATa ESP1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA3
E1971 —	MATa GAL-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) Δsak1::LEU2 MET3-HA3-CDC20::TRP1 SIC1-6PK::HIS3
E1984 —	MATα GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) sak1-G150A-6PK::TRP1MET3-CDC20::URA3
E1996 —	MATa esp1-2 MET3-CDC20::TRP1
E1997 —	MATa esp1-2 MET3-CDC20::URA3
E1998 —	MATa esp1-2 sak1-G150A PDS1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::TRP1
E2013 —	MATa ESP1-6HA::HIS3 MET-CDC20::TRP1
E2015 —	MATa GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) SAK1-6PK::TRP1 Cdc14-6HA::HIS3 MET-CDC20::URA3
E2018 —	MATα Δsnf1::URA3
E2019 —	MATα Δsnf1::URA3 sak1-G150A-6PK::KanMX4
E2020 —	MATa Δsnf1::URA3 CDC14-6HA::HIS3
E2021 —	MATa Δsnf1::URA3 CDC14-HA6::HIS3 sak1-G150A-6PK::KanMX4
E2025 —	DIPLOIDE Δesp1::URA3 CDC14-6HA::HIS3 sak1-G150A-6PK::KanMX4
E2026 —	MATα GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) sak1-G150A-6PK::TRP1 SIC1-6HA::HIS MET3-Cdc20::URA3

CEPA	GENOTIPO
E2027 —	DIPLOID Δsnf1::URA3 CDC14-HA6::HIS3 sak1-G150A-6PK::KanMX4
E2028 —	MATα GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) sak1-G150A-6PK::TRP1 CDC5-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA3
E2029 —	MATα GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) sak1-G150A-6PK::TRP1 PDS1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA3
E2032 —	MATα GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) Δsak1::LEU2_MET3-CDC20::URA3

			~ •							_						-												~ ~			~	
E2033 —	- <i>M</i>	ΑΤα	GA	L1-	FL/	AG-E	SP1	-CI	BD:	T	RP:	1(x	6) <i>i</i>	<u>4</u> sa	1k1	::L	EUZ	2 P	DS:	1-6	HA	::H	153	M	ET.	3-C	DC.	20:	:UF	RA 3	3	

E2	203	84	-		MA	ΙΤα	GA	1 <i>L</i> 1	-FI	LAC	G-ES	SP1	- CB	D::	TR	P1(x6)	Δse	ak1	::Ll	EU2	2 SI	IC1	-6ł	IA:	:HI	S 3	ME	T3	-Cd	c2(0::U	JRA	3	

E2035 —	MATα GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) Δsak1::LEU2 CDC5-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA3
E2036 —	MATα GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) SIC1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA3

E2037 —	MATα GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) PDS1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA3
E2038 —	MATa GAL1-SAK1-TAP::TRP1 ESP1-6HA::HIS MET3-CDC20::LEU2

E2039	—	MATa GAL1-SAK1-TAP::TRP1 esp1-2-6HA::HIS MET3-CDC20::LEU2	

E2040 — *MATα GAL1*-FLAG-*ESP1*-*CBD*::*TRP1(x6) CDC5*-6HA::*HIS3 MET3*-*CDC20*::*URA3*

E204	9		MA	Ta	SI	C1-	6H	A::.	HIS	53 N	ME'I	ГЗ-	CD	C2()::U	JRA	13			
		 				-												 	 	

E2051 — MATα sak1-G150A SIC1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA3

E2050 — MATa esp1-2 Δsak1::TRP1 SIC1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA3

E	20	52		•	MA	Τα	G GA	4 <i>L1</i>	-FI	AC	G- <i>E</i>	SP1	1-C	BD	::T	RP:	1(x	6) .	sca	C1-0	6 <i>H</i> /	4 <i>::1</i>	HIS	3 N	1E1	[3-	CD	C20)::U	RA	3

- E2053 MATα GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) MET3-CDC20::URA3
- E2054 MATα Δsak1::LEU2 SIC1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA3
- E2058 MATα GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) Δsak1::LEU2 SCC1-6HA::HIS3 MET3-Cdc20::URA3
- E2059 MATα GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) sak1-G150A-6PK::TRP1 SCC1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::URA3
- E2060 MATα NET1-mCherry::HIS3 CDC14-EGFP::HIS3 MET3-CDC20::LEU2

E2081 — MATa GAL1-FLAG-ESP1-CBD::TRP1(x6) sak1-G150A-6PK::TRP1

E2089 — MATa Δpep4::HIS3 GAL1-FLAG-ESP1-CBP-TEV-CBD::LEU2 Δsak1::LEU2 MET3-CDC20::URA3

E2095	—	MATα HTB2-mcherry::URA3 ESP1-EGFP::HIS3 MET3-CDC20::LEU2
E2105		MATα sak1-G150A MET3-CDC20::URA3 ESP1-EGFP::HIS3
E2113		MATα esp1-2 SIC1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::LEU2
E2116		MATα esp1-2 sak1-G150A SIC1-6HA::HIS3 MET3-CDC20::LEU2
E2117		MATα Δsak1::LEU2 ESP1-EGFP::HIS3 MET3-CDC20::URA3

 E2132
 —
 MATa esp1-2 Δsnf1::URA3

 E2133
 —
 MATa esp1-2 sak1-G150A-6PK::KanMX4

 E2134
 —
 MATa esp1-2 sak1-G150A-6PK::KanMX4 Δsnf1::URA3

 E2162
 —
 Matα HTB2-mcherry::URA3 ESP1-EGFP::HIS3 Δpds1::TRP1 MET3-CDC20::LEU2

E2178 — Matα sak1-G150A ESP1-eGFP::HIS3 Δpds1::TRP1 MET3-CDC20::URA3

TABLA M2. Tabla con el genotipo de las cepas de *S. cerevisiae* usadas en este trabajo. En azul claro las cepas ya presentes en este laboratorio y en azul oscuro las creadas para este trabajo.



Las células crecieron a 25° C hasta que se determinó que los cultivos alcanzaron la fase exponencial midiendo la densidad óptica (OD_{600} entre 0,4 - 0,6 aprox.) con un espectrofotómetro y se confirmó determinando el índice de gemación (60-70% de células con yema) por análisis visual con el microscopio óptico.

3.2.1. SINCRONIZACIÓN DE CÉLULAS EN MITOSIS MEDIANTE DEPLECIÓN DE *CDC20.*

Las células se pararon en metafase para su sincronización en la transición metafase-anafase mediante depleción de Cdc20. En estas células, se reemplazó el promotor endógeno de CDC20 por el promotor inducible por galactosa, GAL1, o reprimible por metionina, MET3. En la sincronización mediada por GAL1-CDC20, las células crecieron durante toda la noche en medio YPGAL hasta alcanzar la fase exponencial. Para la parada en metafase, las células se filtraron en condiciones de esterilidad, se lavaron con YP, se resuspendieron en YPRAF y crecieron en agitación durante 3-4 horas. La parada en metafase se monitorizó mediante la observación microscópica de la morfología celular, considerando una parada correcta cuando al menos el 90% de las células presentan yemas grandes (de tamaño similar a la célula madre). Las células fueron reintroducidas sincrónicamente en mitosis añadiendo 2% de galactosa directamente al medio de cultivo. En la sincronización mediada por MET3-CDC20, las células crecieron durante toda la noche en medio mínimo con glucosa carente del aminoácido metionina hasta alcanzar la fase exponencial. Para la parada en metafase se cambió el medio de cultivo a YPD y se añadió metionina a una concentración final de 2mM [ForMedium[™]]. Las células se incubaron en agitación de 3 a 4 horas hasta que más del 90% de las células presentan yemas grandes. Para la liberación sincrónica en mitosis, las células se filtraron, se lavaron con agua destilada estéril y se resuspendieron en medio mínimo carente del aminoácido metionina.



3.2.2. INACTIVACIÓN DE LOS ALELOS MUTANTES CONDICIONALES.

La inactivación del alelo termosensible de la separasa *esp1-2* en cultivos en medio líquido en fase exponencial se llevó a cabo a 32 °C durante 4 horas en agitación. En el caso de que la inactivación de la separasa se produzca en células paradas en metafase, primero se llevó a cabo la depleción de Cdc20 durante 2 horas y posteriormente, se incubaron los cultivos a 32 °C durante 3 horas adicionales, antes de la liberación de la parada. Tras la inactivación de la separasa a 32 °C, los cultivos se mantienen a 32 °C durante todo el experimento. Para los ensayos de viabilidad en placa, los cultivos de las cepas que incluyen los alelos termosensibles de la

separasa (*esp1-2*), de *CDC14* (*cdc14-1*) y de *CDC15* (*cdc15-2*) crecieron a 25 °C hasta alcanzar la fase exponencial y las placas se incubaron a cabo a 30 °C para el experimento.

PANDANDANDA

3.2.3. SOBREEXPRESIÓN DE SAK1 Y ESP1.

La sobreexpresión de *SAK1* y *ESP1* se llevó a cabo mediate la expresión ectópica bajo el control del promotor inducible por galactosa, *GAL1*. Para el estudio de la progresión de mitosis con la expresión ectópica de *SAK1* las células se sincronizaron en la transición metafase-anafase por depleción de Cdc20 (*MET3-CDC20*). Las células crecieron en medio mínimo suplementado con 2% de rafinosa en ausencia de metionina hasta fase exponencial. Las células se pararon en metafase cambiando el medio de cultivo a YPRAF y se añadió metionina a una concentración final de 2mM [ForMedium[™]]. Tras la parada en metafase se añadió galactosa al medio de cultivo 1 hora antes de la liberación para la inducción de la expresión de *SAK1*. Para la liberación sincrónica en mitosis, las células se filtraron, se lavaron con agua destilada estéril y se resuspendieron en medio mínimo con galactosa carente del aminoácido metionina. Para la expresión ectópica de *SAK1* o *ESP1* en células paradas en metafase por depleción de Cdc20 (*MET3-*CDC20), las células crecieron en medio mínimo sin metionina suplementado con 2% de rafinosa hasta fase exponencial y se transfirieron a medio YPRAF en presencia de 2mM de metionina. La inducción de *SAK1* o *ESP1* se realizó mediante la adición de 2% de galactosa directamente al medio de cultivo tras la parada en metafase.

3.3. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN GENÉTICA.

3.3.1. TRANSFORMACIÓN DE LEVADURA.

La obtención de genes endógenos etiquetados o la deleción de genes se realizó mediante recombinación homóloga por transformación con productos de PCR (Knop *et al.*, 1999; Wach *et al.*, 1994). Las trasformaciones con plásmidos o productos de PCR se llevaron a cabo mediante el protocolo de transformación de alta eficiencia de acetato de litio y sembradas las células en su correspondiente placa de selección (Gietz and Schiestl, 2007). En las trasformaciones donde la selección se realiza mediante resistencia al antibiótico geneticina se usó el mismo protocolo, pero tras el choque térmico se añadió un paso de incubación en agitación de las células en YPD durante 4h para darles tiempo a las células a expresar el gen de resistencia, previo a la siembra de las células en placas de YPD con geneticina. Para la obtención de las cepas que expresan *CDC20* bajo el control del promotor de galactosa (*GAL1-CDC20*) o de metionina (*MET3-CDC20*) se integraron en el genoma los plásmidos linearizados mediante el corte con la enzima de restricción MscI dentro de la secuencia de *CDC20*. Para la integración del plásmido *GAL1-SAK1-*TAP en el locus *TRP1*, se cortó con el enzima de restricción BstxI, previo a la transformación de las levaduras.



Para la conjugación de dos células haploides de diferente tipo sexual o *mating (MATa y Mata*) se cruzaron en placa durante 24 horas a 25 °C, después los diploides fueron seleccionados en el medio adecuado para cada cruce y sembrado en YPD previos a su esporulación. Posteriormente, se resembraron en placas de esporulación (90 mM AcNaO, 20 mM NaCl, 25 mM KCl y 2 mM MgSO₄) y se dejaron mínimo 4 días a 25 °C para la formación de tétradas. Para preparar las tétradas para su disección y digerir el asca, se incubaron con 0,1% Zimoliasa[™] 20T [AMSBIO[™]] en tampón sorbitol 1M [Sigma-Aldrich[™]] durante 3 minutos a 30 °C. La disección de las esporas se llevó a cabo con el micromanipulador MSM 300 *Sytem dissection microscope*[™] [Singer[™]] y las esporas crecieron en placa no selectiva a 25 °C durante 3 o 4 días. Las esporas segregadas obtenidas fueron genotipadas mediante réplicas en placas de selección correspondiente.

SERVICAS DE ESTUDIO DE PROTEÍNAS.



Los extractos de proteínas para el análisis mediante *Western blot* se obtuvieron mediante el método del ácido tricloroacético o TCA. Las células se centrifugaron para retirar el medio de cultivo y se resuspendieron inmediatamente en 20 % TCA [Sigma-Aldrich[™]] frío, dejando al menos 10 minutos en hielo. A continuación, se hizo un lavado con Tris Base 1M [ForMedium[™]] y se resuspendieron en **tampón de carga 2x SDS-PAGE** (10mM pH 6,8 Tris-HCl, 5mM DTT [ForMedium[™]], 4% SDS [NZYTech[™]], 20% glicerol y 0,002% azul de bromofenol [Sigma[™]]) precalentado 5 minutos a 95º C. Las muestras se hirvieron 2 minutos a 95 ºC, se añadió el mismo volumen de perlas de vidrio (425-600 µm) [Sigma[™]], se hirvieron otros 5 minutos y se llevó a cabo la rotura mecánica de las células usando el homogeneizador Precellys 24[™] [Bertin technologies[™]] mediante 6 ciclos de 5000 rpm durante 30 segundos, para finalmente centrifugar a 12.000 rpm 5 minutos y congelar a -20 °C hasta que se utilicen.

Para llevar a cabo el *Western blot*, los extractos totales de proteínas congelados se hirvieron 5 minutos a 95 °C y se centrifugaron a 12.000 rpm 5 minutos, previamente a cargarse en los geles de acrilamida SDS PAGE del 6%, 8%, 10% o 12%. Se realizó la electroforesis para la separación de las proteínas a 20 mA/gel, durante un tiempo variable dependiendo del porcentaje del gel y del peso molecular de las proteínas de interés. Una vez se resolvió la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas Immobilon® PVDF [Millipore[™]] previamente activadas con 100% metanol [VWR[™]] o nitrocelulosa [Cytiva[™]] a 400 mA durante 1 hora. Las membranas tras la transferencia se bloquearon con PBS-Tween (1X PBS [ForMedium[™]], 0,05%

Tween[®] 20 [Panreac[™]] y 5% leche desnatada en polvo [Panreac[™]]) durante 30 minutos. Posteriormente, las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario durante 1 hora o toda la noche y con el anticuerpo secundario durante 1 hora. Tras cada incubación con un anticuerpo, las membranas se lavan 3 veces con PBS-Tween durante 10 minutos. Para la detección de las proteínas mediante quimioluminiscencia se incubaron las membranas con el reactivo ECL Immobilon[®] [Millipore[™]], con el ECL *West Pico[®]* [Thermo Fisher[™]] o con ECL *Select[®]* [GE Healthcare[™]] siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la visualización y registro de la señal de quimioluminiscencia se utilizó el revelador de imagen Amersham imager 600[®] [GE Healthcare[™]] o ImageQuant[™] LAS 4000 [GE Healthcare[™]]. Las proteínas se cuantificaron usando el software Image J. Para determinar el grado de fosforilación de Esp1, se calcularon las proporciones de las isoformas fosforiladas (bandas de baja migración electroforética) frente a las desfosforiladas (bandas de alta migración electroforética).

ADAMPANDANDANDAN



Para el análisis de las isoformas fosforiladas de separasa se usaron geles de Phos-tag[®] al 10% acrilamida con 100 μ M Phos-tag[®] [Wako[¬]] y 200 μ M Mn₂Cl y la electroforesis se llevó a cabo a 25 mA durante 5 horas. Antes de ser transferidos, los geles se lavaron con 1 mM EDTA durante 10 min para eliminar el manganeso y la transferencia de las proteínas se realizó a 500 mA durante 2 horas en frío.



Los anticuerpos primarios usados son: α -HA clon 12CA5 [Roche^{**}], α -HA de conejo [Sigma^{**}], α -Myc clon 9E10 [Babco^{**}], α -FLAG [Sigma^{**}], α -V5 clon SV5-Pk1 [Serotec^{**}], α -Pgk1 [Invitrogen^{**}] y α -Clb2 [Santa Cruz technologies^{**}] α -PAP [Sigma^{**}]. Los anticuerpos secundarios son: α -ratón-HRP [GE Healthcare^{**}], α -conejo-HRP [GE Healthcare^{**}] y α -cabra-HRP [GE Healthcare^{**}].

3.4.4. COINMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS.

Para los ensayos de coinmunoprecipitación se recogieron 10⁸ células creciendo en fase exponencial, se retiró el medio y se hizo un lavado con 1X PBS. Las células se resuspendieron con **tampón de lisis** (50mM HEPES-KOH pH 7,5 [Merck[™]],70 mM AcO, 5 mM Mg(AcO)₂ [Merck[™]] 10% de glicerol [Sigma[™]], 0,1% Triton X-100[®] [Panreac[™]],1mM DTT) con los siguientes inhibidores de proteasa y fosfatasas: 1X Complete-EDTA free[®] [Roche[™]], 1 mM PMSF, 8 µg/ml aprotinina, 8 µg/ml leupeptina, 8 µg/ml benzamidina, 8 µg/ml pepstatina, µg/ml NaF 4, 5 mM β-glicerolfosfato; y añadiendo 1:1 en volumen de perlas de vidrio (425-600 μm) [Sigma[¬]], para romper mecánicamente las células utilizando el homogeneizador Precellys 24[®] [Bertin technologies[¬]] mediante 6 ciclos de 10 segundos a 5000 rpm. El homogeneizado se clarificó por centrifugación a velocidad máxima durante 10 minutos y se incubó con el anticuerpo primario α-HA de conejo [Sigma[¬]] o α-V5 clon SV5-Pk1 [Serotec[¬]], en hielo durante al menos 1h hora. Después, los inmunocomplejos se adsorbieron a *Dynabeads*[®] conjugadas con proteína A [Life technologies[¬]] durante 1h en movimiento a 4 °C. Después de la incubación, se lavaron las proteínas immunoprecipitadas con el tampón de lisis a concentraciones de AcOK crecientes (100 mM, 120 mM y 150 mM AcOK) y el último lavado con tampón de lisis suplementado con 60 mM AcONa. Las proteínas fueron eluidas con tampón de carga 2x SDS-PAGE y congeladas a -20 °C hasta su posterior procesado por *Western blot*. Las proteínas se cuantificaron usando el software Image J.

En el caso de la inmunoprecipitación de la proteína p*SAK1*-TAP, los extractos proteicos clarificados se incubaron directamente con la resina IgG-agarosa [Life technologies[™]] durante 1 hora, se lavaron con el tamón de lisis y eluidas con el tampón de carga 2x SDS-PAGE.



La purificación de la proteína Esp1 se llevó a cabo mediante la sobreexpresión del constructo GAL1-FLAG-ESP1-CBP-TEV-CBD (CBP: <u>Chitin Binding Protein y CBD</u>: <u>Chitin Binding Domain</u>) en cultivos de levadura. Las células crecieron toda la noche en medio mínimo suplementado con rafinosa hasta alcanzar la fase exponencial, momento en el que se adiciona galactosa al medio de cultivo durante 4 horas para inducir la expresión de FLAG-ESP1-CBP-TEV-CBD. Tras la inducción, se recogieron las células y se resuspendieron en tampón EBX frío (50 mM Hepes/NaOH [pH 7.5], 100 mM KCl, 0.25% Triton X-100, 2.5 mM MgCl₂, 1mM DTT) con inhibidores de fosfatasas y proteasas: 8 µg/ml Aprotinina, 8 µg/ml Pepstatina, 8 µg/ml Leupeptina, 4 mM PMSF, 1X *Complete EDTA free*[®] [Roche[™]]. Para la lisis mecánica se añadió el mismo volumen de perlas de vidrio (425-600 µm) [Sigma[™]] y se rompieron las células durante 12 pulsos de 1 min a 500 rpm en el homogeneizador PULVERISETTE 6[®] [Fritsch[™]]. Tras la rotura, el extracto se centrifugó 1 minuto a 3000 rpm para eliminar las perlas de vidrio y el sobrenadante se clarificó a 14.000 rpm durante 1 hora a 4 ºC. Tras la clarificación, se incubó el extracto con la resina de quitina [New England Biolabs[™]] equilibrada con tampón EBX frío durante 2 horas en rotación a 4 ºC. Tras la unión se lavó la resina de quitina con EBX frío usando las columnas de purificación [Mo-BiTec[™]]. Tras los lavados, se añadió la enzima TEV durante 4 horas en rotación a 4 ºC para eluir la proteína unida. Tras la incubación, se recogió el eluido, se añadió 10% de glicerol y se congeló a -80 ºC. La pureza de la proteína y el rendimiento del proceso se comprobaron mediante electroforesis de proteína y tinción con azul de coomassie y por Western blot, respectivamente.



La proteína Sak1 se inmunoprecipitó a partir de extractos proteicos de células que expresan endógenamente *SAK1* etiquetado con el epítopo V5 siguiendo el mismo procedimiento indicado en el apartado 2.4.3 y utilizando el anticuerpo α-V5 [Serotec[™]]. Tras el último lavado de la inmunoprecipitación se hizo otro lavado con el tampón quinasa (20 mM Hepes pH 7, 0,5 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, y 0,5 mM DTT). Para la reacción enzimática se incubó la proteína Sak1 inmunoprecipitada con 20 µl de reacción que contenían el tapón quinasa con la proteína *FLAG-ESP1-CBP* purificada, 50 mM ATP frío y 1 ci/µl γ-ATP- ³²P. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 20 minutos y se pararon añadiendo tampón de carga 2x SDS-PAGE. El ³²P incorporado por la separasa se detectó utilizando el escáner *PhosphoImager* FLA-500® [Fujifilm[™]] tras resolverse las proteínas mediante electroforesis y transferirse a membrana de nitrocelulosa y se cuantificó usando el programa ImageJ [Wayne Rasband (NIH)]. Las proteínas Esp1 y Sak1 se detectaron mediante *Western blot* y se cuantificaron con el programa Image J. La actividad quinasa de Sak1 sobre separasa se calculó normalizando la señal de separasa fosforilada respecto a la cantidad de enzima (Sak1) y de sustrato (Esp1).



3.5.1. INMUNOFLUORESCENCIA *IN SITU.*

Para la inmunofluorescencia *in situ*, alrededor de 10⁸ células se centrifugaron para retirar el medio de cultivo y se fijaron con 3,7 % de formaldehído [Merck[™]] en tampón fosfato pH 6,4 frío (100 mM fosfato potásico pH 6,4 y 0,5 mM MgCl₂) durante 1h a 25º C o 24 horas a 4º C. Las células fijadas se lavaron con tampón fosfato pH 6,4 sin formaldehido y, posteriormente, con tampón fosfato pH 7,4 (120 mM fosfato potásico pH 7,4, 0,5 mM MgCl, y 1.2 M sorbitol [ForMedium[™]]). Después de los lavados, para la obtención de los esferoplastos mediante la digestión de la pared celular, las células se incubaron con tampón fosfato pH 7,4 conteniendo 0,1 mg/ml Zimoliasa 100T[®] [AMSBIO[™]] y 0,2% β-mercaptoetanol [Merck[™]] entre 30 a 60 minutos a 30 °C. La correcta digestión de los esferoplastos se comprobó mediante la visualización al microscopio de las células mezcladas con 2% de sarcosil. Una vez obtenidos los esferoplastos, se lavaron con tampón fosfato pH 7,4 para eliminar los restos de Zimoliasa. Los esferoplastos se fijaron en portaobjetos multipocillo de vidrio [MP Biomedical[™]] con 0,1% poli-L-Lisina. Para bloquear las uniones inespecíficas se incubaron los esferoplastos con solución de bloqueo PBS-BSA (1X PBS conteniendo 1% de albúmina de suero bovino (BSA) [Panreac[™]]) durante 30 minutos. Una vez bloqueada la preparación, los esferoplastos se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo PBS-BSA a la concentración deseada

durante 1 hora. Tras la incubación del anticuerpo primario, se hicieron 3 lavados con la misma solución de bloqueo PBS-BSA, y se incubaron los esferoplastos con el anticuerpo secundario a la dilución adecuada en solución de bloqueo PBS-BSA durante 40 minutos. Posteriormente, se hicieron 3 lavados con la solución de bloqueo PBS-BSA, se añadió medio de montaje con DAPI Vectashield[®] [Vector laboratories[™]] para la visualización de los núcleos, se cubrieron los portaobjetos con cubreobjetos y se sellaron con esmalte de uñas. Los anticuerpos utilizados para las inmunofluorescencias fueron: Anticuerpos primarios α-HA clon 12CA5 [Roche[¬]], α-HA clon 16B12 [Babco[™]], α-tubulin YOL1/34 [Serotec[™]] y α-Cdc14 [Santa Cruz Biotechnology[™]]; y anticuerpos secundarios anti-cabra marcado con Cy3 α-burro [GE Healthcare[™]], anti-ratón marcado con Cy3 [GE Healthcare[™]] y anti-rata marcado con FITC [Millipore[™]]. Las células se visualizaron y las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio de epifluorescencia invertido Zeiss Axio Observer Z1[®] [Zeiss[™]] con la lámpara de fluorescencia HXP 12C[®] [Zeiss[™]] y el objetivo de inmersión de aceite Plan-Apo[®] 63x N.A 1,4 [Zeiss[™]] o con un microscopio vertical Leica DM6 B Thunder[®] [Leica[™]] con lámpara de fluorescencia LED5[®] [Leica[™]] y el objetivo de inmersión de aceite plan-APO® CS 63x N.A 1,3 [Leica[™]]. La longitud del huso mitótico se midió con las herramientas de análisis cuantitativo del software ZEN 2011 [Zeiss[™]].



Para el experimento de la cuantificación in vivo de la localización subcelular de Cdc14 mediante microscopía de fluorescencia a intervalos de tiempo determinados, se utilizaron cultivos sincronizados en la transición metafase-anafase mediante depleción de Cdc20, MET3-CDC20. Las células se fijaron en portaobjetos multipocillo con cámara de incubación [Ibidi[™]] para microscopía tratados con 1mg/ml concanavalina A en 1x PBS. Las células se visualizaron y adquirieron tomando 5 planos, cada 3 minutos, utilizando un microscopio de epifluorescencia invertido Dmi8 [LEICA], objetivo 100x [LEICA] con la cámara DFC9000GT VSC-07924 [LEI-CA] utilizando el programa LASX. Las imágenes se procesaron utilizando el programa LASX e ImageJ. Para las imágenes representativas se realizó la proyección máxima de los 5 planos. Para la determinación y normalización de los tiempos entre las diferentes células se utilizó la distancia entre las dos señales de Spc422-EGFP. Las señales de Cdc14-EGFP y Net1-mCherry se cuantificaron utilizando el programa ImageJ. Para calcular la variación de la localización nucleolar de Cdc14 a lo largo del tiempo se utilizó el método descrito en el capítulo 5 "Cdc14 Localization as a Marker for Mitotic Exit: In Vivo Quantitative Analysis of Cdc14 Release" del libro "The Mitotic Exit Network: Methods and Protocols" dónde se calcula el coeficiente de variación entre Cdc14 y Net1 ($CV_{Cdc14/Net1}$) = CV_{Cdc14}/CV_{Net1} siendo el coeficiente de variación (CV) = Desviación estándar/ Media y el coeficiente de variación de Cdc14 (Monje-Casas and Queralt, 2017).

El experimento de la determinación subcelular de la separasa mediante microscopía de fluorescencia in vivo se realizó de la misma forma que lo mencionado en el párrafo. Para

la determinación de la localización subcelular se cuantificó la señal de la separasa-EGFP citoplasmática y nuclear, para calcular el ratio de señal nuclear respecto a la señal citosólica. Se realizaron tandas mezclando de dos en dos los cultivos para disminuir la variabilidad en la comparación de cuantificación de la señal de Esp1- EGFP. Se utilizó la señal Htb2-mCherry para distinguir la cepa salvaje o el mutante $\Delta pds1$ en los cultivos dónde se mezclaron las cepas.



La monitorización y clasificación de las células en las diferentes fases del ciclo celular atendiendo a su contenido en ADN se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Las células recogidas se fijaron en 70% etanol y, posteriormente, se digirió el ARN en tampón 50 mM citrato sódico pH 7,4 conteniendo 0,2 mg/ml RNasa [Sigma[™]] durante 1 hora a 50 °C. A continuación, se añadió 1 mg/ml proteinasa K [Sigma[™]] durante 1 hora a 50 °C para digerir las proteínas. Finalmente, se resuspendieron en tampón citrato sódico pH 7,4 con 16 µg/ml yoduro de propidio [Alfa Aesar[™]] para teñir el ADN. El recuento y medición del contenido en ADN se llevó a cabo utilizando el citómetro *Gallios*[®] [Beckman Coulter[™]] y el análisis de los datos se realizó con el programa FlowJO[®] [BD Bioscience[™]].

3.7. PROGRAMAS UTILIZADOS.

Todos los experimentos se repitieron al menos 3 veces. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad (Prism5). El test de *t-student* se utilizó para calcular los p valores. Se consideró estadísticamente significativos los p valores <0.05, **** = p<0.0001, *** = p<0.001; * = p<0.05.



Para la representación de la estructura de las proteínas se utilizó Pymol, para la realización de representaciones esquemáticas se utilizó BioRender, para el estudio de la construcción de plásmidos y análisis de secuencias de ADN se utilizó Benchling y para el estudio de la información sobre proteínas almacenada en bases de datos online se usó PROSITE y STRING.

METODOLOGÍA



RESULTADOS



EVALUATE: 4.1. esp1-2 sak1-G150A Y esp1-2 pah1-C549T SON MUTANTES SUPRESORES DE esp1-2.

La función principal de la separasa es promover la separación de las cromátidas hermanas durante la mitosis mediante el corte proteolítico de una subunidad del complejo cohesina, Scc1. Por otro lado, la separasa también regula la salida de mitosis, la elongación del huso mitótico, la activación de la fosfatasa Cdc14, la condensación del ADN ribosómico (ADNr) y la reparación del ADN (Ulhmann et al., 2000; Jensen et al., 2001; Sullivan et al., 2001; Stegmeier et al., 2002; Sullivan and Uhlmann, 2003; Nagao et al., 2004). Sin embargo, en la mayoría de los casos se desconoce cómo interviene en estos procesos y cuál es el sustrato con el que interactúa. Por esta razón, previamente en nuestro laboratorio se llevó a cabo un rastreo genético de supresores espontáneos del alelo termosensible de la separasa esp1-2, con el objeto de identificar nuevas proteínas relacionadas funcionalmente con la separasa. Los mutantes de alelos termosensibles son aquellos en los que hay una caída en los niveles o actividad del producto del gen cuando se expresa por encima de una determinada temperatura, denominada temperatura restrictiva. Por debajo de la temperatura restrictiva, denominada temperatura permisiva, la actividad y el fenotipo del mutante del alelo termosensible es muy similar a una cepa salvaje. Dependiendo de la afectación al producto del gen mutado se pueden apreciar diferentes niveles de severidad en el fenotipo; incluso, en los casos dónde la proteína codificada por el alelo termosensible sea esencial para la célula, el fenotipo mutante podrá ser apreciable a temperaturas por debajo a la temperatura restrictiva, denominada temperatura semirestrictiva (Fried, 1965; Goldenberg, Smith and King, 1983; Varadarajan, Nagarajaram and Ramakrishnan, 1996; Schuler and Seckler, 1998).

El alelo termosensible *esp1-2*, porta un cambio A/C en la posición 701 del gen *ESP1*, esta mutación ocasiona que estas células no sean capaces de crecer correctamente a temperatura semirestrictiva 30 °C, al presentar la mayoría de las células problemas en la mitosis con 3 signos característicos: el huso mitótico no excede las 2 µm de tamaño, la fosfatasa Cdc14 no se libera del nucleolo y las células presentan núcleos monolobulares. Al final, las células finalizan la mitosis, pero mueren en G1 debido a la segregación de las cromátidas aberrante. (Buonomo *et al.*, 2000; Jensen *et al.*, 2001; Baskerville *et al.*, 2008, Queralt and Uhlman, 2008). Previamente a este trabajo, se realizó un rastreo genético para la identificación de supresores del alelo termosensible *esp1-2*, con la finalidad de encontrar nuevos genes relacionados con la separasa. En dicho rastreo se aislaron 54 mutantes supresores de separasa. Inicialmente, se seleccionaron 3 supresores con diferente grado de supresión del mutante *esp1-2* y se analizaron mediante secuenciación masiva del genoma completo. Tras el análisis bioinformático de la secuenciación masiva se observaron entre 8 a 11 cambios de nucleótidos dentro de ORFs (Tabla TR1). De entre los posibles candidatos se seleccionaron aquellos para los cuales se habían identificado interacciones genéticas o físicas con proteínas mitóticas. Por un lado, se obtuvo que la quinasa Vhs1 coinmunoprecipita con los tres componentes del complejo RENT (*REgulator of Nucleolar silencing and Telophase*): la fosfatasa Cdc14, Net1 (y su parálogo TOF2) y Sir2 (Breitkreutz *et al.*, 2010). En Pah1, se encontró que interacciona con las quinasas de ciclo celular Dbf2 y Cdc28 (Ptacek *et al.*, 2005; Mah *et al.*, 2005). En el caso de Sak1, se describió que interacciona con Cdc28 (Ubersax *et al.*, 2003), con la fosfatasa Cdc14 (Breitkreutz *et al.*, 2010) y con Nud1, uno de los componentes de la ruta MEN (Breitkreutz *et al.*, 2010). Separasa es un regulador clave de la mitosis, así que estas interacciones con mutantes supresores del alelo *esp1-2*, nos indicaría una posible relación funcional entre estas proteínas y separasa.

ADAM DAM DAM DAM DAM DAM

SUPRESOR	ORF	NOMBRE	LOCALIZA	CIÓN	MUTACIÓN
	YDL206W	YDL206W	Cromosoma IV	92341	G/C
	YDR093W	DNF2	Cromosoma IV	632337	T/C
	YDR222W	YDR222W	Cromosoma IV	910423	G/A
	YDR316W	OMS1	Cromosoma IV	1094961	C/A
	YGR099W	TEL2	Cromosoma VII	688388	С/Т
a-5	YHR022C	YHR022C	Cromosoma VIII	150086	G/A
~ 0	YJL025W	RRN7	Cromosoma X	395012	G/T
	YKR009C	FOX2	Cromosoma XI	454707	T/G
	YKR092C	SRP40	Cromosoma XI	613786	A/G
	YMR165C	PAH1	Cromosoma XIII	592082	C/T
	YMR317W	YMR317W	Cromosoma XIII	908594	T/G
	YBL004W	UTP20	Cromosoma II	229139	G/C
	YBR030W	RKM3	Cromosoma II	298523	G/T
	YDL037C	BSC1	Cromosoma IV	385050	T/A
_	YDR247W	VHS1	Cromosoma IV	957172	C/T
α-7	YMR164C	MSS11	Cromosoma XIII	587692	T/C
	YMR300C	ADE4	Cromosoma XIII	865707	T/A
	YNL285W	YNL285W	Cromosoma XIV	96228	С/Т
	YNR065C	YNR065C	Cromosoma XIV	750702; 750706	C/T; A/T
	YDL035C	GPR1	Cromosoma IV	390542	C/T
	YER129W	SAK1	Cromosoma V	417428	G/A
	YKR027W	BCH2	Cromosoma XI	493282	G/C
~ <u>-</u> 20	YMR317W	YMR217W	Cromosoma XIII	908563; 908594	A/G; T/G
u-30	YOR164C	GET4	Cromosoma XV	643869	C/T
	YPL091W	OAZ1	Cromosoma XVI	458946	C/G
	YPL052W	GLR1	Cromosoma XVI	376105	G/A
	YPR093C	ASR1	Cromosoma XVI	719899	G/A

Tabla TR1. Genes supresores candidatos encontrados en el estudio genético de supresores espontáneos del alelo termosensible de separasa (*esp1-2*) y clasificados según la cepa supresora dónde se encontraron. El cuadro muestra las mutaciones aisladas en las tres cepas supresoras candidatas tras el análisis bioinformático del genoma entero de las cepas, después de filtrar polimorfismos.

RESULTADOS

supresoras candidatas en 3 genes diferentes: un cambio C/T en la posición 1161 del gen VHS1, un cambio C/T en la posición 549 del gen PAH1, y un cambio en G/A en la posición 150 del gen SAK1, que originan las mutaciones vhs1-C1161T, pah1-C549T y sak1-G150A, respectivamente. Para validar que el fenotipo supresor observado en las cepas supresoras candidatas se debía únicamente a una única mutación supresora y no al conjunto de varias mutaciones, cruzamos las 3 cepas supresoras candidatas: vhs1-*C1161T, pah1-C549T y sak1-G150A* con una cepa salvaje hasta 3 ocasiones consecutivas y analizamos su descendencia. Por un lado, estudiamos el fenotipo mediante el crecimiento a temperatura restrictiva y semirestrictiva y, se genotiparon las esporas mediante amplificación de la región de los genes ESP1, VHS1, PAH1 y SAK1 por PCR y secuenciación Sanger para determinar que esporas presentaban la mutación supresora. En el caso de VHS1, sólo el 50% de todas las esporas analizadas de la descendencia tras el cruce que mostraban fenotipo supresor del mutante esp1-2 a temperatura semirestrictiva, contenían la mutación *C1161T* en el gen *VHS1*. Esto nos indica que la mutación supresora candidata de VHS1 no es responsable (al menos por si sola) del fenotipo supresor en el mutante esp1-2. Por el contrario, en los casos de PAH1 y SAK1, todas las esporas de la descendencia tras el cruce que presentaban fenotipo supresor de *esp1-2* portaban la mutación de A701C para esp1-2, la mutación G150A para SAK1 y la mutación C549T para PAH1. De esta forma, confirmamos que sak1-G150A y pah1-C549T son mutaciones supresoras de *esp1-2*.

IPAN PAN PAN PAN PAN PAN PAN PAN PAN

Por tanto, basándonos en el trabajo previo del laboratorio se seleccionaron 3 mutaciones

Para confirmar si el fenotipo supresor se mantenía en las cepas de la descendencia tras el cruce que portaban la mutación supresora, realizamos estudios de crecimiento en placa mediante diluciones seriadas, con la cepa salvaje, el mutante *esp1-2*, el mutante sencillo con la mutación supresora de cada respectivo gen, vhs1-C1161T, sak1-G150A *y pah1-C549T*, y el doble mutante *esp1-2* con la mutación supresora correspondiente. Las placas se crecieron a temperatura semirestrictiva de 32 ºC y restrictiva 37 ºC, para analizar el crecimiento de los diferentes mutantes y supresores. Los mutantes supresores esperaríamos que crecieran a 32 ºC, pero no a 37º C. En el caso de VHS1, el 50% de las esporas *esp1-2 vhs1-C1161T* crecían igual que el mutante sencillo *esp1-2* a 32 ^oC (Fig. R1C). Este resultado indica que el fenotipo supresor no se debe a la mutación en VHS1. Por el contrario, las esporas esp1-2 sak1-G150A y esp1-2 pah1-C549T (Fig. R1A y R1C) crecían más que el mutante *esp1-2* a 32 ºC y se morían a 37 ºC, confirmando que sí son mutaciones supresoras de *esp1-2*.

А	25°C	32°C	37°C
Salvaje	•	• • • •	به 🕸 🌑 🔘
sak1-G150A	🔵 🕘 🏶 fe	• • • •	• • • *
esp1-2	🕘 🌒 🍪 🔆	۵ 🐌	
esp1-2 sak1-G150A	• • * *	۰ 🌸 🔘	
esp1-2 sak1-G150A α-30	🕒 🌒 🏶 🔅) 🛞 🔅	
В			
Salvaje	🔵 🏶 🍪 🗧) () () () () () () () () () () () () ()	
pah1-G549A	• * * *	🔘 🌐 🕀 🔸	🕘 💮 🏇 😒
esp1-2	🕘 🌒 🔅 🐖		
esp1-2 pah1-G549T	• • •	🎯 🤃 🦩	
esp1-2 pah1-G549T a-5		🔮 🥴 🍞	
С			
Salvaje		🔹 🏟 🔅 👻	
esp1-2	🖲 🌒 🕫 🦂	@	Ť
esp1-2 vhs1-C1161T	. به چې چ	۰ خ چ	
esp1-2 vhs1-C1161T α-7	• • • •	$\bullet \bullet \bullet *$	

Figura R1. sak1-G150A y pah1-C549T son mutaciones supresoras del alelo termosensible esp1-2. Estudio de crecimiento en placa con diluciones seriadas 1/10, cultivadas en placas de medio rico con 2% glucosa (YPD) a 25 °C, 32 °C y 37 °C, durante 3 días. **A)** Células tipo salvaje (W303), mutante simple de la descendencia tras el cruce del mutante esp1-2 sak1-G150A x W303, mutante esp1-2, espora de la descendencia tras el cruce del mutante esp1-2 sak1-G150A x W303 y cepa original α -30 aislada del estudio genético. **B)** Células tipo salvaje (W303), mutante simple de la descendencia tras el cruce del mutante esp1-2 pah1-G549T x W303, mutante esp1-2, espora de la descendencia tras el cruce del mutante esp1-2 pah1-G549T x W303 y cepa original a-5 aislada del estudio genético. **C)** Células tipo salvaje (W303), espora de la descendencia tras el cruce del mutante esp1-2 Vhs1-C116T x W303, mutante esp1-2 y cepa original α -7 aislada del estudio genético.

4.2. *PAH1* PRESENTA INTERACCIONES GENÉ-TICAS CON *ESP1*.

Una vez establecido que *pah1-C549T* es una mutación supresora del mutante *esp1-2*, procedimos al estudio de la relación funcional entre las dos proteínas. Pah1 es una fosfatidil fosfatasa que regula la conversión de ácido fosfatídico (PA) a diacilglicerol

(DAG) en respuesta a las señales metabólicas de la célula. Pah1 tiene un papel fundamental en el control de la síntesis de la membrana nuclear, actuando como un interruptor que regula la síntesis de fosfolípidos para la biogénesis de nueva membrana o el almacenamiento de fosfolípidos, según las necesidades de la célula (Santos-Rosa et al., 2005; Barbosa et al., 2015). En principio, S. cerevisiae presenta una mitosis cerrada, en la cual la membrana nuclear no se desensambla durante la mitosis, sino que se mantiene intacta, necesitando la síntesis de nueva membrana durante la anafase para permitir la segregación de las cromátidas hermanas. Sin embargo, recientemente hay estudios que apuntan que las diferencias entre la mitosis cerrada y abierta podrían ser menores de lo que estaba establecido, y todos los organismos estudiados hasta el momento desensamblan la membrana nuclear en mayor o menor medida (revisado en Dey et al., 2020). Sea por reensamblaje de la membrana nuclear, o por el aumento de extensión de esta, la regulación de la síntesis de membrana nuclear es crucial durante la mitosis (Sazer et al., 2014). Hasta la fecha, no se ha relacionado a separasa con la regulación de la membrana nuclear durante la mitosis, pero siendo un proceso esencial durante la mitosis, no sorprende que pudiera estar regulado por separasa. Con el fin de analizar el posible papel de separasa en la regulación de la membrana nuclear, estudiamos las interacciones genéticas con esp1-2 en ausencia de PAH1 o sobreexpresando variantes inactivas o activas de PAH1.

PANPANPANPANPANPANPANPAN

Para estudiar la relación entre la ausencia de *PAH1* y el mutante *esp1-2*, lo primero fue preparar cepas que contenían la deleción del gen *PAH1* en una cepa control y un mutante *esp1-2*. La eliminación del gen $\Delta pah1$, se realizó mediante la deleción del gen completo por recombinación homóloga y la correcta eliminación se comprobó mediante genotipado por PCR. Posteriormente, se analizó la viabilidad de los mutantes sencillos y los mutantes dobles mediante estudios de crecimiento en placa de diluciones seriadas a 30 °C y 37 °C. Los estudios de crecimiento en placa muestran que el doble mutante *esp1-2 Apah1* no presenta diferencias de crecimiento respecto al mutante sencillo *esp1-2* a temperatura semirestrictiva de 30 °C (Fig. R2). Como se había descrito, el mutante *Apah1* no crece a 37 °C (Santos-Rosa *et al.*, 2005). Este resultado indica que no hay un efecto epistásico entre las mutaciones *esp1-2 y Apah1*, sugiriendo que *PAH1* y *ESP1* estarían en la misma vía de regulación.

En segundo lugar, analizamos el efecto de sobreexpresar *PAH1* en el mutante *esp1-2*. En este caso, transformamos cepas con plásmidos que sobreexpresan *PAH1* bajo el promotor inducible de galactosa, *GAL1* en cepas control y mutantes *esp1-2* y analizamos el crecimiento mediante ensayos de crecimiento en placa con diluciones seriadas a temperaturas de 30º y 37 ºC en medio con glucosa (no expresión de *GAL1-PAH1*) y con galactosa (expresión de *GAL1-PAH1*). La sobreexpresión de *PAH1* en mutantes de separasa *esp1-2 GAL1-PAH1*, no origina cambios de crecimiento respecto al control que expresa el vector vacío *esp1-2 GAL1-YEplac181*, indicando que la sobreexpresión de *PAH1* no es capaz de suprimir el defecto en el crecimiento del mutante doble *esp1-2*. Asimismo, la sobreexpresión de *PAH1* en una cepa salvaje no muestra efectos sobre su crecimiento (Fig. R3 y R4) ya que, como se describe a continuación, aunque aumentemos los niveles de Pah1, no implica que aumenten los niveles de la proteína Pah1 activa.

TPAN PAN PAN PAN PAN PAN PAN



Figura R2. La ausencia de *PAH1* en el mutante *esp1-2* no aumenta la letalidad a temperatura semirestrictiva. Estudio de crecimiento en placa con diluciones seriadas 1/10, cultivadas en placas de medio rico con 2% glucosa (YPD) a 25 °C, 30 °C y 37 °C, durante 3 días. Células tipo salvaje (W303), mutante Δ*pah1*, mutante *esp1-2* y doble mutante *esp1-2* Δ*pah1*.

Pah1 se encuentra inactiva en el citosol, debido a la fosforilación por las quinasas CKI, CKII Pho85-Pho80, Cdc28-Clb2, PKA y PKC. Cuando la célula se encuentra en situaciones de falta nutrientes, Pah1 es reclutada desde el citosol a la zona de la membrana nuclear y del retículo endoplasmático, donde la fosfatasa Nem1-Spo7 desfosforila a Pah1 en 7 sitios concretos, activándola. La mutación de estos 7 sitios de fosforilación a un aminoácido no fosforilable, alanina, (*S110A/S114A/S168A/S602A/T723A/S744A/S748A*) mimetiza la desfosforilación de Nem1-Spo7 necesaria para su activación, dando lugar a que Pah1 se encuentre constitutivamente activa, *pah1-7A* (O'Hara *et al.*, 2006; Karanasios *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2011). Se ha descrito que la sobreexpresión de *pah1-7A*, al estar constitutivamente activa, reduce la viabilidad celular en condiciones de falta de glucosa (Barbosa *et al.*, 2015), debido a que la balanza de la regulación síntesis/almacenaje de fosfolípidos se inclina hacia el lado del almacenaje en gotas lipídicas, originando ralentización del crecimiento y disminución en la biosíntesis de membrana nuclear, para hacer frente al estrés producido por la falta de este nutriente tan importante.

Por ello, repetimos los ensayos con la sobreexpresión de la forma constitutivamente activa *pah1-7A*. Transformamos las cepas con plásmidos que sobreexpresan la variante mutada en los 7 sitios de fosforilación *GAL1-pah1-7A* y repetimos los ensayos de

crecimiento en placa. Como se había descrito, la sobreexpresión de *GAL1-pah1-7A* reduce el crecimiento en una cepa control (Choi *et al.*, 2011) tanto a 25 °C como a 30 °C. A su vez, la sobreexpresión de *GAL1-pah1-7A* también reduce el crecimiento del mutante *esp1-2* de forma aditiva (Fig. R3). Por tanto, podemos afirmar que existe una interacción genética entre el mutante *esp1-2* y la sobreexpresión de la fosfatasa Pah1 constitutivamente activa.

TPAN PAN PAN PAN PAN



Figura R3. La expresión ectópica de *PAH1* constitutivamente activa (*PAH1-7A*) aumenta la letalidad en el mutante *esp1-2* a temperatura semirestrictiva. Estudio de crecimiento en placa con diluciones seriadas 1/10, cultivadas en placas de medio rico con 2% glucosa (YPD) y medio rico con 2% galactosa + 2% sucrosa (YPGAL) a 25 °C, 30 °C y 37 °C, durante 3 días. Células tipo salvaje (W303) con el vector vacío p*GAL1-YEplac181*, mutante *esp1-2* con el vector vacío p*GAL1-YEplac181*, cepa tipo salvaje con el plásmido *GAL1-PAH1*, mutante *esp1-2* con el plásmido p*GAL1-PAH1*, cepa tipo salvaje con el plásmido p*GAL1-PAH1-7A* y el mutantes *esp1-2* con el plásmido p*GAL1-PAH1-7A*.

Por último, quisimos estudiar el efecto de la sobreexpresión de una versión catalíticamente inactiva de Pah1, *pah1-D398A/D400A*, denominado *pah1-2A*. Este mutante tiene dos mutaciones en su centro catalítico **DXDX[T/V]**, perdiendo su capacidad para realizar la síntesis de diacilglicerol a partir de ácido fosfatídico (Karanasios *et al.*, 2010). La expresión ectópica del mutante *pah1-2A* no afecta el crecimiento en una cepa control. Por el contrario, en el mutante separasa (*esp1-2 GAL1-pah1-2A*) se reduce el crecimiento tanto a 25 °C como a 30° C, comparado con la cepa *esp1-2 GAL1-PAH1*, donde *PAH1* sí tiene función catalítica (Fig. R4). Este resultado indica que hay una interacción genética entre el mutante *esp1-2* y la sobreexpresión de Pah1 catalíticamente inactivo.

Los resultados anteriores muestran que tanto la sobreexpresión de la versión inactiva de Pah1 como la constitutivamente activa tienen un efecto negativo en el crecimiento del mutante en separasa *esp1-2*. Ambos resultados encajan perfectamente con el tipo de afectación que encontraríamos al perturbar el equilibrio de una balanza. Tanto si la balanza se inclina hacia el lado de la formación excesiva de membrana nuclear, como si se inclina a la mayor formación de gotas lipídicas, ambos fenómenos afectan negativamente al normal funcionamiento del ciclo celular. Ninguna interacción genética

estudiada coincide con el resultado del mutante supresor *esp1-2 pah1-C549T*. Por tanto, de momento no podemos concluir si la mutación supresora es activadora o inhibidora de Pah1.

ADAN DAN DAN DAN DAN DAN DAN DAN D



Figura R4. La expresión ectópica de *PAH1* catalíticamente inactiva (*pah1-2A*) aumenta la letalidad en el mutante *esp1-2* a temperatura semirestrictiva. Estudio de crecimiento en placa con diluciones seriadas 1/10, cultivadas en placas de medio rico con 2% glucosa (YPD) y medio rico con 2% galactosa + 2% sucrosa (YPGAL) a 25 °C, 30 °C y 37 °C, durante 3 días. Células tipo salvaje (W303) con el vector vacío p*GAL1-YEplac181*, mutante *esp1-2* con el vector vacío p*GAL1-YEplac181*, tipo salvaje con el plásmido p*GAL1-PAH1*, mutante *esp1-2* con el plásmido p*GAL1-PAH1*, tipo salvaje con el plásmido p*GAL1-PAH1*, wtantes *esp1-2* con el plásmido p*GAL1-PAH1*, tipo salvaje con el plásmido p*GAL1-PAH1-2A*, v el mutantes *esp1-2* con el plásmido p*GAL1-PAH1-2A*.

4.3. SAK1 INTERACCIONA GENÉTICAMENTE CON ESP1.

La segunda mutación supresora del mutante esp1-2 confirmada es sak1-G150A. SAK1, como su nombre indica, Snf1-activating kinase, codifica para la principal quinasa activadora de SNF1 (Sucrose Non-Eermenting 1). Sak1, junto a Tos3 y Elm1, es la quinasa que desempeña el rol más importante en la activación de Snf1 en la vía de la regulación metabólica frente a fuentes alternativas de carbono y diferentes tipos de estrés ambiental, como estrés por Sodio, pH alcalino, falta de nitrógeno y estrés oxidativo (revisado en Hedbacker and Carlson, 2011). Está ampliamente aceptado que la regulación metabólica y el control del ciclo celular están altamente interconectados, aunque muchas de esas conexiones aún no las conocemos en profundidad. Varias de las quinasas que actúan como reguladores principales del ciclo celular Cdc28 y Pho85, también actúan como activadores en procesos metabólicos de regulación de fosfolípidos y glucosa (revisado en Cai and Tu, 2012). De la misma manera, proteínas que actúan como biosensores de disponibilidad de nutrientes y moléculas, como TORC1 (Target of Rapamycin Complex 1) y PKA (Protein Kinase A), presentan unos patrones de actividad periódicos y sincronizados con el ciclo celular (Guerrera et al., 2022). Por tanto, no sorprende que otros componentes tan importantes del ciclo celular, como la separasa,



pudieran tener una conexión con la regulación del metabolismo celular, como pueda ser Sak1. Desde otro punto de vista, puesto que existen *checkpoints* dependientes de la disponibilidad de nutrientes en otras fases del ciclo, también sería factible que pudiera existir otro *checkpoint* en mitosis, independiente del SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*), pero dependiente de los diferentes tipos de estrés mencionados, regulados por Sak1. Por esta razón, nos propusimos analizar la conexión de la separasa con Sak1 en la regulación de la mitosis, estudiando las interacciones genéticas entre la separasa y *SAK1*.

TPAN TPAN TPAN TPAN TPAN TPAN TPAN

Para entender mejor la conexión entre *SAK1* y *ESP1*, empezamos estudiando la relación entre la ausencia de *SAK1* y el mutante *esp1-2*. Para ello preparamos cepas que contenían la deleción del gen *SAK1* en una cepa control y una mutante *esp1-2*. Analizamos el crecimiento de los mutantes sencillos y dobles mediante estudios de crecimiento en placa de diluciones seriadas a temperatura no restrictiva de 25° C y temperaturas semirestrictiva de 30° C y restrictiva de 37° C. El análisis de crecimiento del mutante sencillo *Asak1* muestra que no presenta diferencias con el control ni a 25° C, ni 32° C ni a 37° C. En el caso del doble mutante *esp1-2 Asak1*, se observa que no hay diferencias de crecimiento respecto al mutante sencillo *esp1-2* a temperatura semirestrictiva de 32° C (Fig. R5). Al no observarse diferencias de crecimiento, este resultado nos muestra que *SAK1* y *ESP1* podrían actuar sobre la misma ruta de señalización.



Figura R5. La ausencia de *SAK1* en el mutante *esp1-2* no aumenta la letalidad a temperatura semirestrictiva. Estudio de crecimiento en placa con diluciones seriadas 1/10, cultivadas en placas de medio rico con 2% glucosa (YPD) a 25 °C, 32 °C y 37 °C, durante 3 días. Células tipo salvaje (W303), mutante *Δsak1*, mutante *esp1-2* y doble mutante *esp1-2 Δsak1*.

Posteriormente, analizamos las interacciones genéticas al incrementar la expresión de *SAK1* en el mutante *esp1-2*, para ver que nos revela la sobrexpresión de *SAK1* comparada con los resultados del mutante *esp1-2 sak1-G150A*. Preparamos células que expresan ectópicamente el gen *SAK1* bajo el promotor inducible de galactosa *GAL1*, en cepas control y mutantes *esp1-2* para analizar el crecimiento en ensayos de crecimiento en placa con diluciones seriadas a temperaturas de 32 º y 37 ºC, en medio con glucosa (no expresión

de *GAL1-SAK1*) y galactosa al 2% (expresión de *GAL1-SAK1*). La sobreexpresión de *SAK1* bajo el promotor *GAL1* en una cepa salvaje no muestra efectos sobre su crecimiento. Sin embargo, la sobreexpresión de *SAK1* en el mutante *esp1-2 GAL1-SAK1* recupera el crecimiento respecto al mutante sencillo *esp1-2* a temperatura semirestrictiva 32 °C. Todas las cepas con genotipo *esp1-2* mueren a temperatura restrictiva 37 °C, debido al alelo *esp1-2* (Fig. R6). La recuperación del fenotipo de termosensibilidad del alelo *esp1-2* con la sobreexpresión de *SAK1*, de igual forma que ocurría en el doble mutante *esp1-2 sak1-G150A* (Fig. R1C), apunta que la mutación *G150A* en *SAK1* sería una mutación activadora de la proteína.



Figura R6. La expresión ectópica de *SAK1* reduce la letalidad del mutante *esp1-2* a temperatura semirestrictiva. Estudio de crecimiento en placa con diluciones seriadas 1/10, cultivadas en placas medio rico con 2% glucosa (YPD) y medio rico con 2% galactosa + 2% sucrosa (YPGAL) a 25 °C, 32 °C y 37 °C, durante 3 días. Células tipo salvaje (W303), tipo salvaje que expresan *GAL1-SAK1*, mutante *esp1-2* y el mutante *esp1-2 que expresan GAL1-SAK1*.

Cuando la célula agota la glucosa disponible en el medio, pero tiene a su disposición otras fuentes de carbono, como la galactosa, pone en marcha un mecanismo de represión de los genes necesarios para metabolizar la glucosa y a la vez, activa la expresión de los genes que la célula ahora necesita para usar la galactosa como su fuente de carbono (Weinhandl et al., 2014). Este complejo mecanismo de adaptación lo lleva a cabo la vía de señalización de Snf1. Sak1 es la primera ficha de dominó (conocida) en esta ruta de señalización, que pasa por la fosforilación y activación de Snf1 por Sak1, acabando en la activación de factores de transcripción de los genes necesarios para metabolizar la galactosa (Wilson et al., 1996). En las interacciones genéticas con la sobreexpresión de SAK1, usamos la adicción de galactosa para la activación del promotor GAL1 del plásmido GAL1-SAK1, y por ello nos planteamos si la utilización de la galactosa podría estar afectando al resultado del doble mutante esp1-2 GAL1-SAK1. Para ello, repetimos los estudios de crecimiento en placa con cepas que sobreexpresaban SAK1 en un plásmido multicopia 2µ, bajo el control de su propio promotor en medio con glucosa. La sobreexpresión de SAK1 en plásmidos multicopia no afecta al crecimiento de la cepa control, mientras que en el doble mutante *esp1-2* pSAK1 2µ recupera el fenotipo de termosensibilidad del alelo *esp1-2* a temperatura semirestrictiva de 32 °C (Fig. R7). Este resultado del doble mutante *esp1-2* p*SAK1* 2µ, corresponde con el doble mutante *esp1-2 GAL1-SAK1* suprimiendo el fenotipo termosensible del alelo *esp1-2* a temperaturas semirestrictivas; por lo que, en principio esta interacción genética no se vería afectada por la utilización de galactosa como fuente de carbono para la célula. Por tanto, la sobreexpresión de *SAK1* suprime la letalidad del mutante *esp1-2*, de forma similar que la mutación supresora *G150A*, sugiriendo que es la activación de Sak1 lo que le confiere viabilidad al mutante de la separasa.

ADAM DAM DAM DAM DAM DAM DAM



Figura R7. La sobreexpresión de *SAK1* **en el mutante***esp1-2* **recupera el fenotipo de termosensibilidad del mutante***esp1-2* **a temperatura semirestrictiva.** Estudio de crecimiento en placa con diluciones seriadas 1/10, cultivadas en placas de medio rico con 2% glucosa (YPD) a 25 °C, 32 °C y 37 °C, durante 3 días. Células tipo salvaje (W303) con el vector vacío pRS426, el mutante *esp1-2* con el vector vacío pRS426, células tipo salvaje con el plásmido p*SAK1* 2µ y el mutante *esp1-2* con el plásmido p*SAK1* 2µ.

4.4. LA RELACIÓN ENTRE SAK1 Y ESP1 NO DEPENDE DE SNF1.

Los gran parte de los esfuerzos metabólicos por parte de la célula se llevan a cabo durante la interfase. Durante la mitosis, el gasto metabólico de la célula a priori sería menor, puesto que los transcripción está silenciada casi completamente al estar condensados los cromosomas y por tanto la biogénesis celular estaría reducida al mínimo. Se había aceptado que durante la interfase se creaba un "reservorio de energía" y durante la mitosis se usaba dicho reservorio para llevar a cabo los procesos celulares esenciales. La realidad es bien distinta, la entrada en mitosis engloba el inicio de multitud de procesos que se van a llevar a cabo en un corto periodo de tiempo, de manera altamente sincronizada y que coinciden con un aumento de la producción metabólica (revisado en Pederson, 2003). Al principio de la mitosis. la actividad mitocondrial es alta, a la par que los niveles de ATP, puesto que la célula necesita gran cantidad de energía para la segregación de los cromosomas, el reordenamiento celular, y la restructuración de la membrana nuclear. Diversos reguladores de la actividad mitocondrial son activados en mitosis mediante la ruta de Snf1 (revisado en Salazar-Roa and Malumbres, 2017). Como la segregación de los cromosomas, dirigida por la separasa, requiere de un aporte energético remarcable y la ruta de Snf1 interviene activamente en este proceso, nos preguntamos si ambos eventos podían estar interconectados mediante Sak1.

E 4.4.1 LA INTERACCIÓN GENÉTICA ENTRE *ESP1* Y *SAK1* NO DEPENDE DE *SNF1.*

Para examinar si la interacción genética entre *SAK1* y la separasa pudiera ser consecuencia de la activación de la vía Snf1, iniciada por Sak1, y por tanto pudiera existir una conexión entre la función de la separasa y la regulación metabólica por Snf1 en mitosis, comprobamos las interacciones genéticas entre estos tres componentes: *ESP1, SAK1* y *SNF1*. Creamos cepas que contenían la deleción del gen *SNF1*, obteniendo el mutante doble *esp1-2* Δ *snf1* y mutante triple *esp1-2* Δ *snf1* sak-G150A. Realizamos estudios de crecimiento en placa con diluciones seriadas a temperaturas no restrictiva 25 °C, semirestrictiva 32 °C y restrictiva 37 °C, para el alelo termosensible *esp1-2*. El mutante doble *esp1-2* Δ *snf1* presenta la misma letalidad que el mutante sencillo *esp1-2* a temperatura semirestrictiva y el mutante triple *esp1-2* Δ *snf1* sak-G150A no exhibe una mayor letalidad que el mutante supresor *esp1-2* sak1-G15A (Fig. R8). Por consiguiente, la interacción genética entre *SAK1* y la separasa se da de forma independiente de *SNF1*.



Figura R8. El fenotipo supresor de *esp1-2 sak1G150A* **no depende de** *SNF1*. Estudio de crecimiento en placa con diluciones seriadas 1/10, cultivadas en placas de medio rico con 2% glucosa (YPD) a 25 °C, 32 °C y 37 °C, durante 3 días. Células tipo salvaje (W303), mutante *esp1-2*, mutante doble *esp1-2 Δsnf1*, mutante supresor *esp1-2 sak1-G150A* y el mutante triple *esp1-2 Δsnf1 sak1-G150A*.



4.4.2. LA RELACIÓN ENTRE Sak1 Y LA SEPARASA NO DEPENDE DE LA FOSFORILACIÓN T210 DE Snf1.

Snf1 es el principal sustrato de Sak1. Sak1 fosforila principalmente a Snf1 en la treonina 210 del bucle de activación, activando de esta manera a Snf1 (Nath, McCartney and Schmidt, 2003; Carlson et al., 2010). La fosforilación de Snf1 se utiliza frecuentemente como marcador de la activación de Snf1. Por esta razón, se estudió si Snf1 está activa en ausencia de actividad la separasa y en el mutante supresor. Para ello, se analizaron los niveles de Snf1 fosforilada utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína Snf1 fosforilada en el residuo de activación T210 de Snf1 en las cepas salvaje, mutante sencillo *esp1-2*, sobreexpresión pSAK1 2µ y mutante doble *esp1-2 sak1-G150A*. Las muestras se analizaron en cultivos sincronizados durante la mitosis mediante la depleción y reintroducción de Cdc20 bajo el control del promotor regulable por galactosa GAL1. Primero, se inactivó la expresión de Cdc20 durante 2 horas incubando las células en medio de cultivo en presencia de glucosa. Posteriormente, se transfirieron los cultivos a temperatura semirestrictiva de 32 ºC para la inactivación del alelo esp1-2 durante 3 horas adicionales, mediante las cuales se completó la parada en metafase. Finalmente, los cultivos se liberaron sincrónicamente de la parada en metafase mediante la reintroducción de Cdc20 añadiendo galactosa al medio de cultivo y se recogieron muestras a los tiempos indicados. En el mutante sencillo *Asak1* los niveles de Snf1 fosforilada caen con respecto al control, como era de esperar puesto que Sak1 es la principal quinasa activadora de Snf1, aunque se pueden apreciar pequeñas cantidades de Snf1 fosforilada porque siguen estando presentes Tos1 y Elm3, que también son quinasas de Snf1 (Fig. R9A). Los niveles de Snf1 fosforilada son similares entre la cepa salvaje, el mutante sencillo *esp1-2* (Fig. R9B), la sobrexpresión de pSAK1 2µ (Fig. R9C), y el mutante doble esp1-2 Sak1-G150A (Fig. R9D). Por tanto, la activación de Snf1 no se ve afectada por la actividad de la separasa o la ación de Sak1 sobre la separasa. Teniendo en consideración todos estos resultados juntos, podemos concluir que la relación funcional entre la separasa y Sak1 no está mediada por la vía de regulación de Snf1.





С



D



Figura R9. La fosforilación del residuo de activación T210 de Snf1 por Sak1 es independiente de la actividad de la separasa mediada por Sak1. La fosforilación de Snf1 se analizó por *Western blot*, mediante un anticuerpo que reconoce específicamente la fosforilación del residuo de actvación de Snf1 por Sak1, T210 (P-T210). Los niveles de Pgk1 se usaron como control de carga. **A)** Células tipo salvaje y mutante *Asak1* se pararon en metafase para su sincronización mediante la depleción y reintroducción de Cdc20 durante 4h a 25 °C. **B)** Células tipo salvaje y mutante *esp1-2* se pararon en metafase para su sincronización mediante la depleción de Cdc20 durante 2h a 25 °C, luego se incubaron 3h a 32 °C para la inactivación de la separasa y posteriormente se liberaron mediante reintroducción de Cdc20, a 32 °C. **C)** Células tipo salvaje que contienen el vector vacio pRS426 y la expresión ectópica de p*SAK1-TAP* se pararon en metafase para su sincronización mediante la depleción y reintroducción de Cdc20 durante 4h a 25 °C. La sobreexpresión de *SAK1* se analizó mediante el anticuerpo α-PAP. **D)** Células del mutante *esp1-2* y mutante supresor *esp1-2 sak1-G150A* se pararon en metafase para su sincronización mediante la depleción de Cdc20 durante 2h a 25 °C, después se incubaron 3h a 32 °C para la inactivación de la separasa y posteriormente se liberaron mediante la depleción y reintroducción de Cdc20 durante 4h a 25 °C. La sobreexpresión de *SAK1* se analizó mediante el anticuerpo α-PAP. **D)** Células del mutante *esp1-2* y mutante supresor *esp1-2 sak1-G150A* se pararon en metafase para su sincronización mediante la depleción de Cdc20 durante 2h a 25 °C, después se incubaron 3h a 32 °C para la inactivación de la separasa y posteriormente se liberaron mediante la reintroducción de Cdc20 a 32 °C.



4.5. EL MUTANTE SUPRESOR *esp1-2 sak1-G150A* RECUPERA LAS TRES PRINCIPALES FUNCIONES PROMOVIDAS POR LA SEPARASA EN MITOSIS.

La separasa es uno de los reguladores clave de la mitosis. La activación de la separasa al inicio de la anafase promueve la segregación cromosómica, la activación de la fosfatasa Cdc14, la elongación del huso mitótico y la condensación/resolución del ADN ribosómico (ADNr) (Ulhmann et al., 2000; Jensen et al., 2001; Sullivan et al., 2001; Stegmeier et al., 2002; Sullivan and Uhlmann, 2003). En el caso del alelo esp1-2 estás funciones están afectadas a temperatura semirestrictiva: la célula no segrega correctamente los cromosomas presentando núcleos monolobulares; la activación de la fosfatasa Cdc14 está muy afectada; y no llega a ensamblarse bien el huso mitótico. Por consiguiente, nos preguntamos cuál de las 3 principales funciones reguladas por la separasa estaría regulada por la mutación supresora sak1-G150A. Para responder a esta pregunta, realizamos estudios de progresión en mitosis en cultivos sincronizados desde metafase con *MET3-CDC20*. Los cultivos se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 2 horas, posteriormente se incubaron a 32 ºC durante 3h para la inactivación del alelo *esp1-2*, para finalmente liberar de forma sincronizada los cultivos mediante la reintroducción de Cdc20 y recoger muestras a intervalos determinados a lo largo del ciclo celular. Las muestras fueron procesadas para el análisis de la progresión en el ciclo celular mediante citometría de flujo para analizar el contenido de ADN y determinar cuándo las células entran en una nueva ronda de división celular, e inmunofluorescencia indirecta para la medición de la elongación del huso mitótico, la liberación de Cdc14 del nucleolo y tinción con DAPI para seguir la segregación cromosómica.

Para estudiar la progresión en el ciclo celular, y la entrada en la fase G1 de la nueva ronda de división celular cuantificamos el contenido en ADN mediante citometría de flujo. En metafase tanto la cepa control, como el mutante sencillo *esp1-2*, como el mutante doble *esp1-2 sak1-G150A* muestran un contenido en ADN de 2C (Fig. R10B), ya que las tres cepas llevan a cabo la duplicación del material genético en fase S. En la cepa control, después de mitosis y completar la citocinesis, las células muestran un contenido 1C porque han segregado su material genético y se han dividido correctamente. En el mutante sencillo *esp1-2*, a temperatura semirestrictiva, esto no ocurre de forma correcta ya que al finalizar la mitosis sin segregar las cromátidas hermanas, la mayor parte de las células siguen manteniendo un contenido 2C de ADN y la otra parte de las células que son anucleadas presentan un contenido menor a 1C por tinción del ADN mitocondrial (Fig. R10B). En cambio, en el mutante doble *esp1-2 sak1-G150A* se observa un contenido
1C de ADN después de la mitosis muy similar al de las células de la cepa control (Fig. R10B), indicando que se recupera la segregación cromosómica y la división celular.

En el caso de la levadura de gemación, las células de la cepa control paradas durante la metafase exhiben un huso mitótico con un tamaño menor a 2 μ m, la fosfatasa Cdc14 se encuentra secuestrada en el nucleolo y se observa un único núcleo (Fig. R11). Durante la anafase temprana, el huso mitótico se elonga alcanzando tamaños entre 4 a 6 μ m y Cdc14 se libera del nucleolo, colocalizando con el núcleo. Durante la anafase tardía, el huso mitótico se encuentra completamente elongado, con tamaños de 6 a 12 μ m (denominado huso anafásico), Cdc14 está liberado por toda la célula y el ADN tiene una disposición bilobular con una masa de ADN en cada una de las células hijas. En la telofase, el huso mitótico se desensambla, la proteína Cdc14 vuelve a estar secuestrada en cada nucleolo y cada célula dispone de su núcleo separado. La elongación del huso



Figura R10. El mutante supresor *esp1-2 sak1-G150A* recupera la elongación del huso mitótico, la activación de la fosfatasa Cdc14 y la segregación cromosómica en el mutante *esp1-2*. La cepa salvaje, el mutante *esp1-2* y el mutante doble *esp1-2 sak1-G150A* se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 2h a 25 °C, luego se incubaron 3h a 32 °C para la inactivación de la separasa y posteriormente se liberaron mediante la reintroducción de Cdc20. A) La observación de la liberación de Cdc14 y la elongación del huso mitótico se realizó mediante epifluorescencia indirecta, al menos 100 células fueron contadas en capa cepa. B) El contenido en ADN y la segregación cromosómica se analizó mediante citometría de flujo.





Figura R11. El mutante supresor *esp1-2 sak1-G150A* recupera la liberación de la fosfatasa Cdc14 del nucleolo. Imágenes representativas de la elongación del huso mitótico y liberación de Cdc14 del nucleolo, tomadas mediante epifluorescencia indirecta en muestras fijadas de la cepa salvaje, el mutante *esp1-2* y el mutante *esp1-2 sak1-G150A*. Las células se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 2h a 25 °C, luego se incubaron 3h a 32 °C para inactivar la separasa y posteriormente se liberaron mediante la reintroducción de Cdc20 a 32 °C.



mitótico se produce rigurosamente a la par que la liberación de Cdc14 en una cepa salvaje. Sin embargo, en el alelo termosensible *esp1-2*, cuando lo ponemos a temperatura semirestrictiva, no elonga el huso mitótico, Cdc14 no se libera del nucleolo y no forma núcleos bilobulares (no hay segregación cromosómica) (Fig. R10 y R11). Por el contrario, nuestros resultados muestran como la mayoría de las células en el mutante doble *esp1-2 sak1-G150A* a temperatura semirestrictiva de 32 ºC recuperan la capacidad de elongar el huso mitótico y se desensambla correctamente después en telofase. La fosfatasa Cdc14 sí se libera del nucleolo a la vez que se elonga el huso mitótico, localizándose por todo el citoplasma en anafase y posteriormente se vuelve a resecuestrar al nucleolo en telofase (Fig. R10A y R11). Estos resultados muestran que el mutante doble *esp1-2 sak1-G150A* recupera los tres principales procesos regulados por la separasa durante la mitosis.

4.6. LA SOBREEXPRESIÓN DE SAK1 EN EL MUTANTE esp1-2 RECUPERA LAS FUNCIONES PROMOVIDAS POR LA SEPARASA EN MITOSIS.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las interacciones genéticas entre SAK1 y ESP1, la sobrexpresión de Sak1 recupera el fenotipo de termosensibilidad del alelo esp1-2 a temperatura semirestrictiva, de igual forma que lo hace el mutante doble esp1-2 sak1-G150A. Teniendo en cuenta que el mutante doble esp1-2 sak1-G150A recupera las funciones principales reguladas por la separasa, quisimos comprobar si la sobrexpresión de Sak1 en el mutante esp1-2 también recupera esas mismas funciones. Para responder a esta pregunta, realizamos los estudios de progresión en mitosis sobreexpresando SAK1 mediante un plásmido multicopia (esp1-2 pSAK1-TAP) o mediante la expresión ectópica de SAK1 bajo el control del promotor regulable por galactosa GAL1 (esp1-2 GAL1-SAK1-TAP) a temperaturas semirestrictivas. En el caso de la sobreexpresión SAK1 bajo su propio promotor en un plásmido 2 µm esp1-2 pSAK1-TAP, se sincronizaron los cultivos en mitosis mediante la depleción de Cdc20 durante 2 horas para parar las células en metafase, se inactivó la separasa a temperatura semirestrictiva de 32 ºC durante 3 horas, para posteriormente liberar los cultivos de forma sincronizada mediante la reintroducción de Cdc20. Como se observa en la figura R12, en la cepa *esp1-2* no hay prácticamente liberación de Cdc14 del nucleolo ni elongación del huso mitótico (Fig. R12A) y no se segregan las cromátidas hermanas (Fig. R12B); mientras que en la cepa esp1-2 pSAK1-TAP sí se produce la elongación del huso mitótico a la par que se libera Cdc14 del nucleolo (Fig. R10A y R11) y sí se segregan las cromátidas hermanas (Fig. R10B) de igual forma que los resultados previos obtenidos en el mutante doble *esp1-2 sak1-G150A*.



Figura R12. La expresión pSAK1-TAP 2μ a temperatura
semirestrictiva, recupera la elongación del huso mitótico, la
activación y liberación de la fosfatasa Cdc14 y la segregación
cromosómica en el mutante esp1-2. El mutante esp1-2 con el
vector vacío pRS426 y el mutante esp1-2 pSAK1-TAP se pararon
en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 2h a 25 °C,
luego se incubaron 3h a 32 °C para la inactivación de la separasa y
posteriormente se liberaron mediante la reintroducción de Cdc20.
A) La observación de la liberación de Cdc14 y la elongación del huso
mitótico se realizó mediante epifluorescencia indirecta, al menos
100 células fueron contadas en capa cepa. B) El contenido en ADN
y la segregación cromosómica se analizó mediante citometría de
flujo con tinción de yoduro de propidio.Tiempo
min.





Figura R13. La expresión ectópica de *SAK1 (GAL1-SAK1*-TAP) en galactosa a temperatura semirestrictiva recupera la elongación del huso mitótico, la activación y liberación de la fosfatasa Cdc14 y la segregación cromosómica en el mutante *esp1-2.* El mutante *esp1-2 GAL1-SAK1*-TAP se paró en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 2h a 25 °C, luego se incubó 3h a 32 °C para la inactivación de la separasa, el cultivo se dividió en dos, un cultivo se mantuvo en un medio con 2% rafinosa y al otro se mantuvo en un medio con 2% galactosa. Tras 1h, se liberaron ambos cultivos mediante la reintroducción de Cdc20. AJ La observación de la liberación de Cdc14 y la elongación del huso mitótico se realizó mediante epifluorescencia indirecta, al menos 100 células fueron contadas en capa cepa. BJ El contenido en ADN y la segregación cromosómica se analizó mediante citometría de flujo.



De forma similar, en el caso de la sobreexpresión ectópica de *SAK1* bajo el promotor inducible de galactosa en el mutante *esp1-2 GAL1-SAK1-TAP*, se analizaron las muestras del mutante sencillo *esp1-2, esp1-2 GAL1-SAK1-TAP* sin galactosa (no expresión de *SAK1*) y *esp1-2 GAL1-SAK1-TAP* con galactosa (expresión de *SAK1*). Las células se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20, tras 2 horas se transfirieron a temperatura semirestrictiva de 32º C para inactivar la separasa durante 2 horas, luego se adicionó la galactosa y se incubaron los cultivos 1 hora más, para posteriormente liberar los cultivos de la parada mediante la reintroducción de Cdc20. Los datos obtenidos nos muestran que a diferencia de las cepas *esp1-2 y esp1-2 GAL1-SAK1-TAP* sin galactosa (no expresión de *SAK1*), la cepa *esp1-2 GAL1-SAK1-TAP* en presencia de galactosa elonga el huso mitótico, libera Cdc14 del nucleolo (Fig. R13A) y segrega las cromátidas hermanas (Fig. R13B). En conjunto, los resultados obtenidos de la sobreexpresión de *SAK1* en el mutante *esp1-2* a temperatura semirestrictiva muestran que recupera los procesos principales regulados por la separasa, de forma similar a lo que ocurría con el mutante supresor *esp1-2 sak1-G150A*.

4.7. EL MUTANTE esp1-2 Δsak1 NO MUESTRA DIFERENCIAS EN LA PROGRESIÓN EN MITOSIS RESPECTO AL MUTANTE SENCILLO esp1-2.

En el estudio de las interacciones genéticas en la delección del gen SAK1 y el mutante esp1-2 observamos que no existían diferencias de crecimiento entre el mutante sencillo esp1-2 y el mutante doble esp1-2 Asak1 a temperatura semirestrictiva, lo que nos sugería que Sak1 podría estar actuando sobre la misma ruta que la separasa. A continuación, investigamos si la ausencia de SAK1 podría afectar a alguna de las funciones reguladas por la separasa en estudios de progresión en mitosis con células sincronizadas en la transición metafase-anafase, mediante la depleción y reintroducción de Cdc20. Para ello los cultivos se pararon 2 horas mediante la depleción de Cdc20 y se inactivó el alelo esp1-2 a temperatura semirestrictiva de 32º C durante las 3 horas previas a la liberación sincrónica en anafase. Los resultados obtenidos de las muestras analizadas mediante microscopía de fluorescencia indirecta nos muestran que en el mutante doble esp1-2 Asak1 prácticamente no hay elongación del huso mitótico ni liberación de la fosfatasa Cdc14 del nucleolo (Fig. R14A), al igual que ocurría con el mutante sencillo esp1-2. Tampoco se observa segregación cromosómica cuando se analiza el contenido en ADN mediante citometría de flujo en el mutante doble *esp1-2 Δsak1* (Fig. R14B). Estos resultados nos muestran que no existen diferencias entre el mutante sencillo esp1-2 y el mutante doble *esp1-2 Δsak1* en la progresión de mitosis.





Figura R14. La ausencia de Sak1 en el mutante *esp1-2 Δsak1* **no afecta a la progresión de la mitosis respecto al mutante** *sencillo esp1-2.* El mutante *esp1-2* y el doble mutante *esp1-2 Δsak1* se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 2h a 25 °C, luego se incubaron 3h a 32 °C para la inactivación de la separasa y posteriormente se liberaron de forma sincrónica mediante la reintroducción de Cdc20. A) La observación de la liberación de Cdc14 y la elongación del huso mitótico se realizó mediante epifluorescencia indirecta, al menos 100 células fueron contadas en capa cepa. B) El contenido en ADN y la segregación cromosómica se analizó mediante citometría de flujo.

osomica se analizo mediante citometria de flujo. 1C 2C Cont. ADN

😂 4.7. PAPEL DE Sak1 EN LA ACTIVACIÓN DE Cdc14.

Aunque la principal función de la separasa es la escisión de las cromátidas hermanas para dar lugar al inicio de la anafase, está descrito que la liberación de Cdc14 del nucleolo es independiente de su función principal cortando a la cohesina y que la función de la separasa en la regulación de Cdc14 es condición necesaria para la salida de mitosis. (Sullivan et al., 2004; Queralt et al., 2006). La regulación de la fosfatasa Cdc14 a lo largo de la mitosis se regula por dos vías diferenciadas y a la vez interconectadas: la vía FEAR (*Cdc-Fourteen Early Anaphase Release*) y la vía MEN (*Mitotic Exit Network*) (revisado en Queralt and Uhlmann, 2008; Rock and Amon, 2009). La vía FEAR inicia la liberación de Cdc14 del nucleolo y su activación al principio de la anafase, posteriormente la vía MEN se encarga de mantener la localización y activación de Cdc14 durante la anafase tardía (Jaspersen et al., 1998; Visintin et al., 1998; Shou et al., 1999; Traverso et al., 2001). La separasa es uno de los principales componentes de la vía FEAR junto con la quinasa polo Cdc5, la proteína asociada al cinetocoro Slk19, la proteína nucleolar Spo12 (en levaduras Bns1), la ciclina Clb2 y la proteína Hit1 (Zeng *et al.*, 1999; Stegmeier, Visintin and Amon, 2002; Visintin, Stegmeier and Amon, 2003; Stegmeier et al., 2004; Azzam et al., 2004; Queralt et al., 2006; de Los Santos-Velázquez et al., 2007). En metafase, Cdc14 se encuentra unida a su inhibidor Cif1/Net1 y secuestrada en el nucleolo (Traverso et al.,

esp1-2 ∆sak1

Tiempo

min

50

40

30

20

10

2001). Al inicio de la anafase, cuando se activa la separasa, inhibe a la fosfatasa PP2A-Cdc55, provocando que Net1 ahora esté en su estado fosforilado, dejando a Cdc14 libre y activa en el núcleo (Queralt *et al.*, 2006). Los mutantes de los principales componentes de la vía FEAR presentan retrasos en la liberación de Cdc14 del nucleolo durante la anafase temprana y son sintético letales con mutantes de la ruta MEN (Stegmeier, Visintin and Amon, 2002; Sullivan *et al.*, 2004 Higuchi and Uhlmann, 2005; Sánchez-Diaz *et al.*, 2012).

4.7.1. LA SOBREEXPRESIÓN DE SAK1 POR SI SOLA NO ACTIVA A Cdc14.

En el estudio de la progresión en mitosis en el mutante *esp1-2 pSAK1*-TAP y el mutante esp1-2 GAL1-SAK1-TAP hemos demostrado que la sobreexpresión de SAK1 recupera la capacidad de liberar Cdc14 del nucleolo, la elongación del huso mitótico y la correcta segregación cromosómica. Esta demostrado que la sobreexpresión de la separasa, en células paradas en metafase, es suficiente para la liberación de Cdc14, la elongación del huso mitótico y segregación de los cromosomas, aunque no es suficiente para la correcta salida de mitosis a G₁ (Sullivan and Uhlmann, 2003). Por eso, es importante conocer si alguna de estas tres funciones también depende de la función de Sak1 o si Sak1 estaría actuando aguas arriba de la separasa. Por consiguiente, para estudiar la capacidad de Sak1 promoviendo la activación de Cdc14 estudiamos si la expresión ectópica de SAK1 por si sola es capaz de liberar a Cdc14 del nucleolo, como ocurre con la expresión ectópica de ESP1 y ZDS1 (Sullivan and Uhlmann, 2003; Queralt and Uhlmann, 2008; Calabria et al., 2012). Para ello, se realizó el estudio de la expresión ectópica de SAK1 bajo el promotor regulable por galactosa GAL1 (GAL1-SAK1-TAP) en células paradas en metafase mediante la depleción de Cdc20. Una vez se pararon los cultivos en metafase, se realizó la adición de galactosa al medio de cultivo para la expresión de SAK1 y la recolección de muestras, sin liberar los cultivos de la parada en metafase. Los resultados analizados mediante fluorescencia indirecta de las muestras GAL1-SAK1-TAP sin galactosa (no expresión de SAK1) y con galactosa (expresión de SAK1) nos muestran que, en ambos casos, las células permanecen paradas en metafase sin elongación del huso mitótico, ni liberación de Cdc14 del nucleolo (Fig. R15A). El análisis del contenido de ADN mediante citometría de flujo, en ambos casos, mostró que no se produce la segregación cromosómica ni la salida de mitosis (Fig. R15B). Estos resultados nos indican que la expresión ectópica de SAK1 por sí sola no es capaz de liberar Cdc14 del nucleolo a diferencia de lo descrito para las expresiones ectópicas de ESP1 y ZDS1; sugiriendo que Sak1 actúa aguas arriba de la separasa.





Figura R15. La expresión ectópica de SAK1 por sí sola no es capaz de liberar Cdc14 del nucleolo. La cepa *GAL1-SAK1*-TAP se paró en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 4h a 25 ^oC. Una vez paradas las células en metafase, se dividieron en dos cultivos: uno se mantuvo en 2% rafinosa y en el otro se adicionó 2% galactosa. En ambos cultivos se mantuvo la depleción de Cdc20 y se recogieron las muestras en los tiempos indicados. **A)** La observación de la liberación de Cdc14 del nucleolo y la elongación del huso mitótico se realizó mediante epifluorescencia indirecta, al menos 100 células fueron contadas en cada condición. **B)** El contenido en ADN y la segregación cromosómica se analizó mediante citometría de flujo.

nin. 0 1C 2C Cont. ADN GAL1-SAK1 [2% Galactosa] Tiempo min. 100 80 60 40 20 0 1C 2C Cont. ADN

Tras comprobar que la expresión ectópica de *SAK1* por sí sola no es capaz de liberar a Cdc14 del nucleolo, analizamos si la sobrexpresión de SAK1 genera algún efecto sobre la liberación de Cdc14, la elongación del huso mitótico o la segregación cromosómica durante la mitosis en una cepa salvaje. Para ello, se llevó a cabo estudios de progresión en mitosis a 25° C en cepas control mediante la expresión ectópica de SAK1 bajo el promotor regulable por galactosa *GAL1* (*GAL1-SAK1*-TAP) y cepas control que expresaban SAK1 bajo su propio promotor en plásmidos multicopia pSAK1 2µm. Los cultivos celulares se sincronizaron y liberaron desde la transición metafase-anafase mediante la depleción y reintroducción de Cdc20. Las muestras analizadas mediante microscopía de fluorescencia indirecta no muestran cambio alguno en los tiempos de la liberación de Cdc14 y la elongación del huso mitótico en las cepas GAL1-SAK1-TAP con galactosa (expresión de SAK1) respecto a las muestras sin galactosa (no expresión de SAK1) (Fig. 16A). Tampoco muestra ningún cambio en cuanto a la segregación cromosómica ni la salida de mitosis de acuerdo a los análisis del contenido en ADN mediante citometría de flujo. La cepa que sobreexpresa Sak1 con el plásmido p*SAK1* 2µm tampoco muestra diferencias en la progresión de mitosis con respecto a la cepa control (Fig. 16B). Estos resultados sugieren que, en presencia de actividad normal de la separasa, Sak1 no produce una aceleración de la progresión y salida de mitosis.



Figura R16. La sobreexpresión de *SAK1* no altera la progresión en mitosis en condiciones de actividad normal de la separasa. A) La cepa con el vector vacío pRS426 y la cepa con vector p*SAK1*-TAP se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 4h a 25 °C, posteriormente se liberaron de la parada mediante la reintroducción de Cdc20. B) La cepa *GAL1-SAK1*-TAP se paró en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 4h a 25 °C. Una vez paradas las células en metafase, se dividieron en dos cultivos: uno se mantuvo en 2% rafinosa y al otro se adicionó 2% galactosa. Posteriormente se liberaron mediante la reintroducción de Cdc20. La observación de la liberación de Cdc14 y la elongación del huso mitótico se realizó mediante epifluorescencia indirecta, al menos 100 células fueron contadas en capa condición.

4.7.2. EL MUTANTE Δsak1 PRESENTA UN RETRASO EN LA LIBERACIÓN DE LA FOSFATASA Cdc14 AL INICIO DE LA ANAFASE.

Para seguir estudiando la relación de Sak1 con a la separasa en la regulación de la mitosis, realizamos un estudio de progresión en mitosis utilizando las cepas con la delección del gen *SAK1* en un fondo genético salavaje. Para ello se sincronizando las células en la transición metafase-anafase mediante la depleción y reintroducción de Cdc20. Como cabe esperar, en la cepa control la liberación de Cdc14 tiene lugar de forma sincrónica a la elongación del huso mitótico (Fig. R17A). Las muestras obtenidas y analizadas mediante microscopía de fluorescencia indirecta mostraron que el mutante Δ sak1 presenta un retraso en la liberación de la fosfatasa Cdc14 con respecto a la elongación del huso mitótico al inicio de la anafase (tiempos 10 y 15 minutos) (Figura R17A). Sin embargo, la progresión de mitosis y la salida a la nueva fase G1 no están afectados en el mutante Δ sak1 como se observa en el análisis del contenido en ADN mediante citometría de flujo (Fig. R17C). El retraso en la liberación de Cdc14 se comprobó analizando la localización de Cdc14 respecto a la longitud del huso mitótico. Se consideran células en metafase las que presentan una longitud del huso mitótico menor o igual a 2 µm. Las células en anafase temprana tienen una longitud del huso mitótico entre 2 a 6 µm; mientras que las células en anafase tardía tienen un huso mayor de 6 µm. Cuando analizamos el porcentaje de células que muestran Cdc14 liberado del nucleolo con un tamaño de huso mitótico entre 2 a 6 µm, se observa que el porcentaje de células con Cdc14 liberado es mucho menor en el mutante *Asak1* en comparación a la cepa salavaje (Figura R17B). El retraso de la liberación de Cdc14 del nucleolo durante la anafase temprana es un fenotipo característico de los mutantes de la vía FEAR (Stegmeier *et al.*, 2002; Sullivan *et al.*, 2004; Higuchi and Uhlmann, 2005; Sánchez-Diaz *et al.*, 2012). Por tanto, los resultados obtenidos en el mutante sencillo *Asak1*, sugiere que Sak1 estaría relacionado en la regulación de la fosfatasa Cdc14 durante la anafase temprana, y podría ser un nuevo componente de la ruta FEAR.

A DAMPANDANDANDANDANDANDAN



Figura R17. El mutante Δsak1 origina un retraso en la liberación de la fosfatasa Cdc14 al inicio de la anafase. La cepa salvaje y el mutante Δsak1 se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 4h a 25 °C, posteriormente se liberaron sincronicamente a anafase mediante la reintroducción de Cdc20. A) y B) La observación de la liberación de Cdc14 y la medición de la elongación del huso mitótico se realizó mediante epifluorescencia indirecta, al menos 100 células fueron contadas en cada cepa y para rango de tamaños del huso mitótico. C) El contenido en ADN y la segregación cromosómica se analizó mediante citometría.

Cdc14 durante la mayor parte del ciclo celular se encuentra unida e inactiva a la proteína Net1 que la mantiene localizada en el nucleolo (revisado en Queralt & Uhlmann, 2008). Durante la anafase temprana, Net1 se fosforila por la activación de la vía FEAR y pierde afinidad por Cdc14, dando lugar a una primera liberación de Cdc14 que pasará a localizarse en el núcleo. Posteriormente, la vía MEN mantiene Net1 fosforilado, desencadenando la liberación final de Cdc14 por toda la célula. Al final de la mitosis, Cdc14 es resecuestrada en el nucleolo justo antes de que la célula entre en citocinesis (Jaspersen *et al.,* 1998; Visintin *et al.,* 1998; Stegmeier *et al.,* 2002; Mohl *et al.,* 2009; Shou *et al.,* 2002; Roccuzzo *et al.,* 2015; Rodriguez-Rodriguez *et al.,* 2016).

Los resultados obtenidos en el estudio de progresión en mitosis nos muestran un retraso en la liberación de Cdc14 en la cepa mutante $\Delta sak1$ respecto a la cepa salvaje, sugiriendo una posible implicación de Sak1 en la regulación de Cdc14 durante la anafase temprana. Para corroborar estos resultados, llevamos a cabo un análisis de los cambios de localización de Cdc14 mediante una cuantificación in vivo de la proteína Cdc14 liberada del nucleolo. Para poder realizar este análisis se prepararon cepas control y mutante $\Delta sak1$ que expresan la proteína Net1 marcada con la proteína fluorescente mCherry, la proteína Cdc14 marcada con la proteína fluorescente EGFP (Enhanced <u>Green Elorescent Protein</u>) y, adicionalmente, la proteína Spc42, que forma parte del centro organizador de microtúbulos (equivalente al centrosoma en levaduras), marcada con la proteína fluorescente EYFP (Enhanced Yellow Elorescent Protein). El análisis de los cambios de la localización nucleolar de Cdc14 se llevó a cabo en experimentos de intervalos de tiempo in vivo mediante microscopía de fluorescencia en cultivos celulares sincronizados en mitosis, mediante la depleción y reintroducción de Cdc20. La progresión de mitosis se monitorizó midiendo la distancia entre las señales de los dos centros organizadores de microtúbulos correspondiente a la señal de la proteína marcada Spc42-EYFP. La determinación de la localización nucleolar de Cdc14 se llevó a cabo comparando los valores del Coeficiente de variación (CV) de Cdc14 respecto a Net1, obtenidos mediante la cuantificación de la señal de Cdc14 marcada con EGFP y de la señal de Net1 marcada con mCherry como se describió previamente (Neurohr and Mendoza, 2017). La disminución del CV_{Cdc14} respecto al CV_{Net1} nos indica la liberación de Cdc14 del nucleolo. Los resultados obtenidos de la cuantificación y análisis de la localización de Cdc14 respecto a Net1 nos muestran que el mutante *Asak1* presenta un retraso en la liberación de Cdc14, especialmente a longitudes del huso mitótico más cortas, respecto a una cepa salvaje (Fig. R18A y R18B). Estos datos in vivo muestran resultados similares a los obtenidos del estudio de progresión en mitosis con muestras fijadas (Fig. R17), señalando que el mutante sencillo *Asak1* presenta un retraso en la liberación de Cdc14 característico de los mutantes de la vía FEAR y nos sugieren que Sak1 estaría implicado en la liberación de Cdc14 en la anafase temprana.



D



Figura R18. El mutante Δsak1 presenta un retraso de 10 min. aprox. en la liberación de la fosfatasa Cdc14 respecto a la cepa salvaje. La cepa salvaje y el mutante Δsak1 se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 4h a 25 °C, posteriormente se liberaron sincrónicamente a anafase mediante la reintroducción de Cdc20. A) Imágenes representativas de diferentes tiempos de la mitosis de células que expresan Spc42-EYFP, Cdc14-EGFP y Net1-mCherry. B) Cuantificación de los coeficientes de variación (CV) de la señal de Cdc14-EGFP y Net1-mCherry para determinar la localización nucleolar de Cdc14 (CV Cdc14 nucleolar o CV_{Net1/Cdc14}= CV_{Cdc14}/ CV_{Net1}). Se analizó un mínimo de 10 células para cada cepa. La gráfica muestra la media del CV_{Cdc14}/ CV_{Net1} y la desviación estándar para cada tiempo.

4.8. Sak1 ES UN NUEVO COMPONENTE DE LA VÍA FEAR.

La segunda vía implicada en la regulación de la fosfatasa Cdc14 durante la anafase tardía es la vía MEN (*Mitotic Exit Network*). La activación de Cdc14 durante la anafase temprana mediada por FEAR, promueve la desfosforilación y activación de la quinasa de la ruta MEN Cdc15, que a su vez activaría a la quinasa Dbf2-Mob1 y finalmente a Cdc14 (Jaspersen et al., 1998; Visintin et al., 1998; Shou et al., 1999; Traverso et al., 2001). Además, también se ha descrito que la activación de Cdc14 por la ruta FEAR coordina la segregación del nucléolo con la señalización de la salida de mitosis, de forma que no se puede activar la ruta MEN hasta que se ha producido correctamente la condensación y segregación del DNA ribosómico (Yellman and Roeder 2015; Santos-Vazquez et al., 2017). La función final de la vía MEN es la activación total y distribución citoplasmática de la fosfatasa Cdc14. En estos momentos, Cdc14 promueve la salida de mitosis mediante la desfosforilación de los sustratos previamente fosforilados por Cdc28-Clb2; desfosforila y estabiliza a Sic1, el inhibidor de Cdc28; y desfosforila al segundo coactivador de APC, Cdh1, el cual regula la degradación de la quinasa Polo Cdc5 y de las ciclinas mitóticas. La desfosforilación de estos sustratos es un paso necesario para la salida de mitosis (Stegmeier et al., 2002; Sullivan and Uhlmann, 2003; Visintin et al., 2008; Sánchez-Diaz et al., 2012).

4.8.1. EL MUTANTE DOBLE Δsak1 cdc15-2 MUESTRA UN MENOR CRECIMIENTO QUE EL MUTANTE SENCILLO cdc15-2.

Los resultados obtenidos del análisis de la progresión en mitosis del mutante $\Delta sak1$ nos muestran un retraso en la liberación de la fosfatasa Cdc14, similar a lo observado en mutantes de la ruta FEAR. Está ampliamente caracterizado que mutantes de la vía FEAR presentan interacciones sintético letales con mutantes de la vía MEN, como cdc15-2, dbf2-2, tem1-3 (Stegmeier et al., 2002; Sullivan et al., 2004; Higuchi and Uhlmann 2005; Sánchez-Diaz et al., 2012). Las rutas FEAR y MEN tienen como finalidad última la regulación y activación de Cdc14, requisito indispensable para la salida de mitosis (Stegmeier *et al.*, 2002; Azzam *et al.*, 2004; Yellman *et al.*, 2006; Rahal and Amon, 2008). Para confirmar que Sak1 es un componente de la ruta FEAR procedimos a comprobar las interacciones genéticas entre SAK1 y CDC15. Para ello, combinamos la deleción de SAK1 ($\Delta sak1$) con el alelo termosensible cdc15-2 y analizamos el crecimiento de los mutantes sencillos y dobles, mediante estudios de crecimiento en placa de diluciones seriadas a temperatura normal 25 °C, temperaturas semirestrictiva 32 °C y restrictiva 37 ^oC. El doble mutante Δsak1 cdc15-2 no es viable a temperatura semirestrictiva de 32 ^oC, a diferencia del mutante sencillo *cdc15-2* que aún es capaz de crecer (Fig. R19). Como cabría esperar a 37 ºC, las cepas que contienen el alelo *cdc15-2* mutante son inviables, ya que en el mutante *cdc15-2* a temperatura restrictiva, la quinasa Cdc15 pierde su función y la células quedan bloqueadas en anafase (Hartwell *et al.*, 1973; Mah *et al.*, 2001). El resultado del doble mutante $\Delta sak1 \ cdc15-2$ nos muestra que existe un efecto epistásico entre las mutaciones en SAK1 y CDC15, de forma similar al observado en mutantes en FEAR, sugiriendo que Sak1 sería un componente de la vía FEAR.



Figura R19. La ausencia de SAK1 presenta un efecto epistásico con el mutante *cdc15-2* **a temperatura semirestrictiva.** Estudio de crecimiento en placa con diluciones seriadas 1/10, cultivadas en placas de medio rico con 2% glucosa (YPD) a 25 °C, 32 °C y 37 °C, durante 3 días. Células tipo salvaje (W303), mutante *Δsak1*, mutante *cdc15-2* y doble mutante *cdc15-2 Δsak1*.

La sobreexpresión de algunos componentes de FEAR, como SP012 y ZDS1, son capaces de recuperar la letalidad de diferentes mutantes de la ruta MEN (Queralt and Uhlmann, 2008; Rossio et al., 2013; Caydasi et al., 2017). Por ello, a continuación, estudiamos si la sobreexpresión de SAK1 también es capaz de recuperar la letalidad del mutante cdc15-2. Para ello se prepararon cepas que sobreexpresaban el gen SAK1 bajo el promotor inducible por galactosa GAL1 en cepas control y mutante termosensible cdc15-2. Se estudió el crecimiento de los mutantes sencillos y dobles en ensayos de crecimiento en placa con diluciones seriadas a temperatura no restrictiva 25 ºC, semirestrictiva 32 °C y restrictiva 37 °C. La sobreexpresión de SAK1 (galactosa) nos muestra que no existen diferencias de crecimiento en la cepa GAL1-SAK1 cdc15-2 respecto al mutante sencillo cdc15-2 a temperatura semirestrictiva (Fig. R20). Por tanto, a diferencia de otros componentes de la ruta FEAR la expresión ectópica de SAK1 no es capaz de recuperar la letalidad del mutante *cdc15-2*. Este resultado es consistente con el hecho que la sobreexpresión de SAK1 por sí sola no es capaz de liberar a Cdc14 del nucleolo (Fig. 16A); mientras que las expresiones ectópicas de SP012, ZDS1, ESP1 sí que liberan a Cdc14 del nucleolo en células paradas en metafase (Shah et al., 2001; Queralt et al., 2006; Sullivan and Uhlmann, 2003; Lu and Cross, 2009; Rossio et al., 2013; Caydasi et al., 2017).



Figura R20. La expresión ectópica de *SAK1* no presenta cambios de crecimiento frente al mutante *cdc15-2 GAL1-SAK1*. Estudio de crecimiento en placa con diluciones seriadas 1/10, cultivadas en placas de medio rico con 2% glucosa (YPD) y medio rico con 2% galactosa y 2% sucrosa (YPGAL) a 25 °C, 32 °C y 37 °C, durante 3 días. Células tipo salvaje (W303), mutante *cdc15-2*, tipo salvaje con el vector *GAL1-SAK1* y el mutante *cdc15-2*.

4.8.2. SAK1 PRESENTA INTERACCIONES SINTÉTICO LETALES CON CDC14.

En los mutantes de MEN, las células se paran en anafase con Cdc14 secuestrado en el nucleolo, pero sí se produce una liberación inicial y transitoria de Cdc14 al núcleo por la activación de la ruta FEAR. En el mutante *cdc14-1*, como Cdc14 es parte tanto de la ruta FEAR y la ruta MEN, no se llega a activar Cdc14 en ningún momento (Marston, Lee and Amon, 2003). Se ha descrito que tanto mutantes de la vía FEAR como de la vía MEN

presentan interacciones letales sintéticas con mutantes en *cdc14* (Visintin *et al.*, 1998; Jaspersen *et al.*, 1998). Para estudiar si mutaciones en *SAK1* también tienen interacciones sintético letales con los mutantes de *cdc14*, se prepararon cepas que contenían la deleción del gen *SAK1* en cepas control y mutante sencillo *cdc14-1*. A continuación, se estudió la viabilidad de los mutantes sencillos y dobles mediante los experimentos de crecimiento en placa con diluciones seriadas a temperatura no restrictiva 25 ° C, semirestrictiva 32 °C y restrictiva 37 °C para el alelo termosensible *cdc14-1*. El mutante doble *cdc14-1 Asak1* crece menos que el mutante sencillo *cdc14-1* a temperatura semirestrictiva de 32 °C (Fig. R21). Este resultado nos muestra que existe una interacción sintético letal entre la deleción del gen *SAK1* y el mutante *cdc14-1*.

IPANIPANIPANIPANIPANIPANIPANIPANIP



Figura R21. La ausencia de SAK1 presenta un defecto de crecimiento en el mutante *cdc14-1* **a temperatura semirestrictiva.** Estudio de crecimiento en placa con diluciones seriadas 1/10, cultivadas en placas de medio rico con 2% glucosa (YPD) a 25 °C, 32 °C y 37 °C, durante 3 días. Células tipo salvaje (W303), mutante *Δsak1*, mutante *cdc14-1* y doble mutante *cdc14-1 Δsak1*.

Tras examinar los estudios de crecimiento con la deleción del gen *SAK1* y el mutante *cdc14-1*, llevamos a cabo la comprobación de las interacciones genéticas del mutante *sak1-G150A* con el mutante *cdc14-1*. En estos experimentos podemos observar como el mutante doble *sak1-G150A cdc14-1* no recupera el fenotipo del mutante sencillo *cdc14-1* a temperatura semirestrictiva (Fig. R22). Este resultado puede explicarse ya que Cdc14 también tiene implicaciones aguas arriba en la ruta FEAR, se podría estar dando una sinergia negativa entre la activación de Sak1 y la afectación de Cdc14 en el doble mutante *sak1-G150A cdc14-1*. Ya que Cdc14 actúa tanto en la ruta FEAR como en MEN, Sak1 no estaría suprimiendo ambasvías. Por tanto, teniendo en cuenta los resultados de las interacciones genéticas, podemos concluir que las mutaciones de *SAK1* se comportan de forma similar a mutantes de la ruta FEAR, siendo sintético letales con mutantes en *cdc15-2* y *cdc14-1*. Esto, junto con el fenotipo de retraso de la liberación de Cdc14 en anafase temprana, también característico de los mutantes de la vía FEAR, nos indica que Sak1 sería un nuevo componente de la ruta FEAR.



Figura R22. El mutante doble *cdc14-1 sak1-G150A* **crece menos que el mutante** *cdc14-1* **a temperatura semirestrictiva.** Estudio de crecimiento en placa con diluciones seriadas 1/10, cultivadas en placas de medio rico con 2% glucosa (YPD) a 25 °C, 32 °C y 37 °C, durante 3 días. Células tipo salvaje (W303), mutante *sak1-G150A*, mutante *cdc14-1* y doble mutante *cdc14-1 sak1-G150A*.

4.9. LA SEPARASA NO ACTÚA MEDIANTE SU ACTIVIDAD PROTEOLITICA SOBRE Sak1.

La separasa es una endopeptidasa de la familia de las cisteín proteasas cuya principal función es realizar el corte en la subunidad *Kleisina* de cohesina (Rad21 en humanos y *S. pombe*, y Mcd1/Scc1 en *S. cerevisiae*), provocando de forma irreversible la separación de la cromátidas hermanas y marcando el inicio de la anafase (Uhlmann *et al.*, 1999; Uhlmann *et al.*, 2000; Waizenegger *et al.*, 2000; Tomonaga *et al.*, 2000). En estudios posteriores, se descubrió que pese a la especificidad que mostraba separasa por la cohesina, existían otros sustratos que son cortados por la separasa, como la proteína Slk19. La separasa estaría actuando en anafase sobre Slk19 cortándola, lo que promueve la función de Slk19 en la estabilización del huso mitótico (Sullivan *et al.*, 2001; Buonomo *et al.*, 2003; Luo and Tong, 2018).

La separasa es hasta el momento, la única proteasa conocida con especificidad por sustrato que está activa en la transición metafase-anafase. El hecho de que la separasa sea capaz de cortar otros sustratos diferentes a la cohesina, nos hizo plantearnos si la interacción entre Sak1 y Esp1 pudiera llevarse a cabo mediante la actividad proteolítica de la separasa sobre Sak1. Para comprobarlo, estudiamos si la expresión ectópica de separasa producía la escisión de Sak1. Para ello, preparamos cepas control y mutante sencillo *sak1-G150A* dónde se sobreexpresa *ESP1* etiquetada con el epítopo FLAG bajo el promotor inducible de galactosa y, además, portaban la proteína Sak1 etiquetada con el epítopo V5 (*P and V proteins of the paramyxovirus*). Las células se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20. Cuando confirmamos, mediante observación morfológica de las células, que los cultivos celulares se encontraban completamente sincronizados en metafase, se adicionó galactosa a los cultivos para inducir la sobreexpresión de *ESP1* y comenzamos la recogida de muestras a los tiempos indicados,



sin liberar los cultivos de metafase. Estas muestras se procesaron y se analizaron por *Western blot* con anticuerpos que reconocen específicamente el epítopo FLAG y el epítopo V5. Tras la expresión ectópica de separasa, no se observó ningún cambio en las bandas detectadas de Sak1-V5 en ninguna de las dos cepas analizadas (Fig. R23); sugiriendo que Sak1 no se procesa por la separasa. Por tanto, podemos concluir que a pesar de que la principal función de la separasa es su actividad proteolítica, la interacción entre Sak1 y la separasa no ocasiona la escisión de Sak1.

ADAMPANDANDANDANDAN



Figura R23. La separasa no corta a Sak1. El corte de la separasa sobre Sak1 se comprobó en la cepa *GAL1-ESP1*-FLAG *SAK1*-V5 y en la cepa *GAL1-ESP1*-FLAG *sak1-G150A*-V5. Las células se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 4h a 25 °C. Una vez paradas las células, se adicionó 2% galactosa para inducir la sobreexpresión de *ESP1*. La sobreexpresión de Esp1 se analizó mediante el anticuerpo α -Flag y los posibles fragmentos de Sak1 con el anticuerpo α -V5. Los niveles de Pgk1 se usaron como control de carga.

4.10. EL MUTANTE SUPRESOR *esp1-2 sak1-G150A* RECUPERA LA CAPACIDAD DE CORTE DE LA SEPARASA EN EL MUTANTE *esp1-2.*

Una vez descartado que la separasa no esté actuando mediante su actividad proteolítica sobre Sak1, nos replanteamos el fenotipo del mutante supresor *esp1-2 sak1-G150A*. En los estudios de progresión en mitosis, observamos como el doble mutante *esp1-2 sak1-G150A* recupera las tres principales funciones reguladas por la separasa que se encuentran afectadas en el mutante *esp1-2*, sugiriendo que hay una reactivación de la separasa. Esto implica que la separasa debe estar presente en el mutante *esp1-2*, a pesar de que en los mutantes termosensibles se supone que la proteína se degrada al elevar la temperatura. Por esa razón, nos surgieron estas preguntas: ¿La supresión depende de la presencia de Esp1? ¿Se degrada la separasa en el alelo *esp1-2* a temperatura semirestrictiva? Para responder a estas preguntas y determinar si la separasa se degrada en el alelo *esp1-2*, llevamos a cabo estudios de progresión en mitosis con las cepas control, mutante *esp1-2* y mutante doble *esp1-2 sak1-G150A* dónde se expresa la proteína Esp1 etiquetada con el epítopo HA (*Human influenza hemagglutinin*). Los cultivos se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 2 horas; a continuación, se inactivó la separasa a temperatura semirestrictiva de 32° C durante 3 horas, para posteriormente liberar los cultivos de forma sincronizada, mediante la reintroducción de Cdc20. Los niveles de la proteína separasa se analizaron por *Western blot* mediante el anticuerpo que reconoce el epítopo HA. En la cepa control los niveles de separasa no cambian durante la progresión de mitosis como estaba descrito, en cepas que llevan el alelo *esp1-2* se sigue observando presencia de separasa a temperatura semirestrictiva, indicando que la supresión del mutante *sak1-G150A* se puede deber a una reactivación de la separasa.

TPAN TPAN TPAN TPAN TPAN TP



Figura R24. La separasa está presente en el mutante *esp1-2* **en mitosis.** Los niveles proteicos de la separasa se comprobaron en la cepa *ESP1*-6HA, *esp1-2*-6HA y en la cepa *esp1-2*-6HA *sak1-G150A*. Las células se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 2h a 25 °C, luego se incubaron 3h a 32 °C para la inactivación de la separasa y posteriormente se liberaron sincrónicamemte en anafase mediante la reintroducción de Cdc20. Los niveles de Pgk1 se usaron como control de carga.

En línea con el estudio de los niveles de la proteína separasa en el mutante *esp1-2*, también comprobamos los niveles de la separasa en la cepa salvaje, para ver si si la ausencia de Sak1 en el mutante de delección $\Delta sak1$ afecta a los niveles de separasa. Realizamos estudios de progresión en mitosis en cepas control, mutante $\Delta sak1$ y mutante *sak1-G150A* que expresaban Esp1 etiquetada con el epítopo HA. Los cultivos se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 4 horas a 25º C, para posteriormente liberar los cultivos de forma sincronizada, mediante la reintroducción de Cdc20. En el caso de los mutantes $\Delta sak1$ y *sak1-G150A* no se observan diferencias en los niveles de la proteína separasa respecto a la cepa control (Fig. R25). La falta de Sak1 o la mutación *sak1-G150A* por si solas no parecen afectar a los niveles totales de la separasa.



Figura R25. Los niveles proteícos de la separasa no se ven alterados en los mutantes *Asak1 y sak1-G150A.* Los niveles proteicos de la separasa se comprobaron en la cepa *ESP1-*6HA, *ESP1-*6HA *Asak1* y en la cepa *ESP1-*6HA *sak1-G150A.* Las células se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 4h a 25 °C, posteriormente se liberaron mediante la reintroducción de Cdc20. Los niveles de Pgk1 se usaron como control de carga.

A continuación, para entender la extensión del fenotipo supresor se analizaron diferentes marcadores de progresión de la mitosis, cómo la degradación de la securina, el corte de la subunidad Scc1 de la cohesina, y la degradación de la ciclina Clb2. La securina, codificada por el gen *PDS1* en *S. cerevisiae*, es una chaperona que se localiza principalmente en el núcleo y que regula a la separasa tanto negativa como positivamente (Cohen-Fix and, Koshland, 1999). Pds1 se une a la separasa, actuando como pseudosustrato, ejerciendo una regulación negativa al bloquear su centro activo e inhibir su capacidad proteolítica (Funabiki et al., 1996; Ciosk et al., 1998; Zou et al., 1999). Por otro lado, esta unión de la securina a la separasa actúa positivamente, ocasionando que la separasa se localice en el núcleo, dónde llevará a cabo su función y a la vez origina un cambio conformacional en la separasa, quedando la separasa preparada para actuar en cuanto se separe de la securina. La unión de la securina a la separasa se produce durante la transición G_1/S_2 . Después, el complejo separasa-securina se localiza en el núcleo hasta el inicio de la mitosis, cuando Pds1 es marcada para su degradación por el complejo APC^{Cdc20}. Tras la degradación de la securina, la separasa queda libre de su inhibición, activándose su función proteolítica y sus otras funciones mitóticas, dando lugar al inicio de la anafase (Cohen-Fix et al., 1996; Yamamoto et al., 1996a; Visintin et al., 1997; Uhlmann et al., 1999; Jensen *et al.*, 2001; Agarwal and Cohen-Fix, 2002). El complejo cohesina mantiene unidas a las cromátidas hermanas hasta el momento en que la separasa corta específicamente a la subunidad Scc1, desestabilizando la unión de todo el complejo, permitiendo la separación de las cromátidas hermanas e iniciando de forma irreversible la transición de metafase a anafase (Uhlmann, Lottspeich, & Nasmyth, 1999; Nasmyth, Peters and Uhlmann, 2000; Uhlmann, 2000; Koshland and Guacci, 2000). La separasa también lleva a cabo la activación de las fosfatasa Cdc14 que, a su vez activa al complejo APC^{Cdh1} promoviendo la degradación de las ciclinas mitóticas, como Clb2, y también la quinasa Cdc5, requisito indispensable para salir de mitosis (Visintin et al., 1998; Jaspersen et al., 1998; Lee *et al.*, 2001; Queralt *et al.*, 2006; Stegmeier and Amon, 2004; Queralt *et al.*, 2008).

En los estudios de progresión en mitosis, observamos que el mutante doble esp1-2 sak1-G150A recuperaba las funciones principales de la separasa estudiadas. Para caracterizar en mayor profundidad el fenotipo supresor se analizaron los marcadores mitóticos mediante estudios de progresión en mitosis con cepas control, mutante sencillo *esp1-2* y mutante doble *esp1-2 sak1-G150A* que expresaban Scc1, y Pds1 etiquetadas con el epítopo HA. Los cultivos se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 2 horas; a continuación, se inactivó la separasa a temperatura semirestrictiva de 32 ºC durante 3 horas, para posteriormente liberar los cultivos de forma sincronizada, mediante la reintroducción de Cdc20. La separasa corta a la subunidad Scc1, mayoritariamente por el residuo 268 del extremo N-terminal, produciendo un fragmento más pequeño denominado Scc1²⁶⁰⁻⁵⁶⁶. La presencia de este fragmento en los análisis por Western blot es indicativo de la escisión del complejo de las cohesinas por la separasa (Hao et al., 2001). Como se puede apreciar en la figura R26, en la cepa control se observa la aparición del fragmento de Scc1²⁶⁰⁻⁵⁶⁶ cortada al inicio de la anafase (15 min.) como cabría esperar. En el mutante sencillo esp1-2, apenas se observa proteína Scc1²⁶⁰⁻ ⁵⁶⁶ cortada por la separasa, mientras que en el mutante doble *esp1-2 sak1-G150A* se recuperan los niveles de Scc1²⁶⁰⁻⁵⁶⁶ cortada por la separasa similares a la cepa control (Fig. R26). Estos resultados nos indican que el fallo en la segregación cromosómica del mutante esp1-2, se rescata en el mutante doble esp1-2 sak1-G150A debido a que la separasa es capaz de llevar a cabo de nuevo el corte de Scc1, recuperando la segregación de las cromátidas hermanas.

En una cepa salvaje, los niveles de la ciclina Clb2 aumentan desde la fase S hasta llegar a G_2 , acumulándose al inicio de la mitosis y llegando a su punto máximo durante la metafase para después caer drásticamente, debido a que Clb2 es marcada para su degradación primero por el complejo APC^{Cdc20}, produciendo la primera onda de degradación de Clb2 y más tarde por APC^{Cdh1}, que elimina totalmente a Clb2, ya que es requisito indispensable para salir de mitosis (Wäsch and Cross, 2002). Sin embargo, en el mutante *esp1-2*, al no activarse Cdc14, APC^{Cdh1} no se activa y Clb2 no llegará a degradarse (Queralt *et al.*, 2006). Los resultados muestran que no hay disminución de los niveles de Clb2 en el mutante *esp1-2* (Fig. R26), tal y como está descrito para el fenotipo de este mutante; pero en el caso del mutante supresor *esp1-2 sak1-G150A* se observa un patrón de degradación de Clb2 durante la anafase, similar al patrón de Clb2 en el control. Esto resultados nos indican que en el mutante supresor *esp1-2 sak1-G150A* también estaría activo el complejo APC^{Cdh1}, disminuyendo la actividad del complejo Cdk1-Clb2 y alcanzando uno de los principales requisitos para que la célula pueda salir de mitosis y avanzar a G₁.



Figura R26. El mutante supresor *esp1-2 sak1-G150A* recupera la capacidad de corte de la separasa respecto a la alteración en el mutante *esp1-2*. Las células se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 2h a 25 °C, luego se incubaron 3h a 32 °C para la inactivación de la separasa y posteriormente se liberaron sincrónicamente en anafase mediante la reintroducción de Cdc20. Las proteínas Scc1, Pds1 y Sic1 etiquetadas con el epítopo HA, se detectaron mediante un anticuerpo α -HA y los niveles de Clb2 mediante un anticuerpo específico α -Clb2. Los niveles de Pgk1 se usaron como control de carga.

Para terminar de recabar toda la información posible acerca de la función de la proteína Sak1 respecto a la separasa, estudiamos a los diferentes marcadores de mitosis (Scc1, Pds1 y Clb2) en el alelo mutante *sak1-G150A*, pero esta vez en una cepa salvaje. Con tal fin, realizamos estudios de progresión en mitosis en cepas control, mutante *Asak1 y* mutante sencillo *sak1-G150A* que expresaban Scc1, Pds1 y Sic1 etiquetadas con el epítopo HA. Los cultivos se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 4 horas a 25 °C, para posteriormente liberar los cultivos de forma sincronizada en anafase, mediante la reintroducción de Cdc20. No se observan diferencias en los tiempos, ni en la cantidad de proteína Scc1²⁶⁰⁻⁵⁶⁶ cortada por Esp1, ni en el mutante *sak1-G150A*, no se aprecian cambios en los tiempos de corte de la cohesina por la actividad proteolítica de la separasa. En el caso de la securina, no se observan cambios en la cinética de degradación de la proteína Pds1 entre el control y el mutante *sak1-G150A* (Fig. R27). Este resultado nos muestra que en el mutante *sak1-G150A* no se está viendo afectado la activación del complejo APC^{Cdc20} para la degradación de la securina. En cuanto a la degradación de Clb2 durante la mitosis, no se observan cambios entre el mutante *sak1-G150A* y el control (Fig. R27). La dinámica de degradación de Clb2 por el complejo APC no se ve afectada en el mutante *sak1-G150A*. Por otro lado, en el caso de Sic1 se aprecia un pequeño retraso en la acumulación de Sic1 en anafase tardía en ausencia de Sak1 (Fig. R27), consistente con el retraso en la activación de Cdc14 en anafase temprana (Fig. R17 y R18).



Figura R27. Los marcadores de progresión de mitosis no están alterados en los mutantes *Asak1 y sak1-G150A.* Los niveles proteicos de la separasa se comprobaron en la cepa *ESP1-*6HA, *ESP1-*6HA *Asak1* y en la cepa *ESP1-*6HA *sak1-G150A*. Las células se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 4h a 25 °C, posteriormente se liberaron mediante la reintroducción de Cdc20. Los niveles de Pgk1 se usaron como control de carga.

4.11. LA SOBREXPRESIÓN ECTÓPICA DE LA SEPARASA EN EL MUTANTE sak1-G150A, EN AUSENCIA DE Cdc20, PERMITE LA PROGRESIÓN EN MITOSIS.

En los ensayos con el alelo mutante *esp1-2*, hemos estudiado la relación entre la separasa y la proteína Sak1 en condiciones dónde la separasa presentaba problemas en la segregación cromosómica, debido a la escasa actividad proteolítica de la separasa sobre la cohesina, pero para conocer más acerca de la relación de estas dos proteínas, nos propusimos explorar otras situaciones en las que la alteración de la regulación de la separasa no fuera perjudicial para el correcto funcionamiento de la maquinaria celular durante la mitosis. Se tiene conocimiento que la sobreexpresión de la separasa en células humanas causa alteraciones en la segregación cromosómica dando a lugar diferentes tipos de cáncer, debido a una segregación prematura o descontrolada de las cromátidas hermanas (Meyer *et al.*, 2009; Mukherjee *et al.*, 2014).

La regulación de la separasa está altamente controlada durante la mitosis y adicionalmente a la regulación directa ejercida por la unión de la securina, existen otros factores que orquestan un modelo preciso para que no haya la posibilidad de fallos durante la mitosis, como la ciclina Clb2, o el inhibidor de Cdc28, Sic1 (Ciosk et al., 1998; Kumada *et al.*, 1998). La ciclina Clb2 es uno de estos factores que regulan a la separasa, mediante su unión a la principal quinasa de mitosis, formando el complejo Cdk1-Clb2. El complejo Cdc28-Clb2 en levaduras, cumple la función de activar el complejo APC^{Cdc20} al inicio de la anafase, desencadenando la degradación de la securina (Fujimitsu, Grimaldi and Yamano, 2016; Zhang et al., 2016), pero se ha visto que adicionalmente promueve la actividad de la separasa fosforilándola durante el inicio de la anafase (Lianga et al., 2019). Por el contrario, en el caso de los vertebrados, la fosforilación de Cdk1 sobre la separasa tendría un carácter inhibitorio y redundante a la función de la securina (Stemmann et al., 2001; Gorr, Boos and Stemmann, 2005). A su vez, otro factor involucrado en la regulación del ciclo celular es el inhibidor Sic1, que inhibe a los complejos Cdc28-Clb5 durante G₁ (Verma et al., 1997). La inhibición del complejo Cdc28-Clb5 por Sic1 es esencial en la salida de mitosis y entrada en G₁, para que la célula inicie la formación del complejo prereplicativo y esté preparada para replicar el material genético durante la fase S. Además, esta inhibición es necesaria para que termine el desensamblaje del huso mitótico. Una vez la célula está lista para entrar en la fase S, Sic1 es marcado para su degradación mediante ubiquitinación por el complejo SCF^{Cdc4}(Schwob *et al.*, 1994; Feldman et al., 1997; Skowyra et al., 1997; Orlicky et al., 2003).

En las levaduras, se ha demostrado que la expresión ectópica controlada de la separasa en metafase es suficiente por si sola para la liberación y activación de la proteína Cdc14 (Sullivan and Uhlmann, 2003), por lo que queríamos investigar más acerca de la relación de Sak1 y la separasa en condiciones dónde expresáramos de forma ectópica a la separasa. Para ello, realizamos estudios de progresión en mitosis con las cepas control, mutante $\Delta sak1$ y sak1-G150A que expresan de forma ectópica el gen ESP1 bajo el promotor inducible por galactosa GAL1. Los cultivos se pararon y sincronizaron en metafase mediante la depleción de Cdc20, tras 4 horas de paradas se adicionó galactosa para inducir la expresión de GAL1-ESP1-TAP, sin liberar los cultivos de metafase. Las muestras se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta para la medición de la elongación del huso mitótico, la liberación de Cdc14 del nucleolo y de núcleos con DAPI para seguir la segregación cromosómica. En las figuras R28 y R29A podemos ver como la expresión ectópica de la separasa bajo el promotor *GAL1*, aún con la depleción de Cdc20, es capaz de activar Cdc14, tal y cómo está descrito. En el mutante $\Delta sak1$ con la expresión ectópica de la separasa no presenta diferencias en la liberación de Cdc14 respecto al control, sin embargo, en el mutante sak1-G150A bajo la expresión ectópica de la separasa no sólo se produce la liberación de Cdc14 y elonga el huso mitótico, sino que posteriormente Cdc14 se resecuestra al nucleolo, se desensambla el huso mitótico y se dividen los núcleos (Fig. R28 y R29A). Es decir, la célula parece progresar en mitosis y salir a G₁ como ocurre en un ciclo celular normal.

Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo confirman que en el control con la sobrexpresión ectópica de la separasa por sí sola no es suficiente para que dé lugar a la segregación cromosómica y la salida de mitosis, del mismo modo que podemos observar en el mutante sencillo $\Delta sak1$. De forma contraria, resultados nos muestran que en el mutante sak1-G150A junto la sobrexpresión ectópica de la separasa es suficiente para que se produzca la segregación cromosómica y las células sean capaces de finalizar mitosis, saliendo a G₁ (Fig. R29B). Ambos resultados nos indicarían que en el caso de la sobrexpresión ectópica de la separasa en el mutante sak1-G150A la separasa no sólo sería capaz de llevar a cabo sus funciones catalíticas, sino que también sus funciones proteolíticas, permitiendo la segregación de las cromátidas hermanas.





Figura R28. El mutante supresor *esp1-2 sak1-G150A* **recupera la elongación del huso mitótico y la liberación de la fosfatasa Cdc14 del nucleolo.** Imágenes representativas de la elongación del huso mitótico, la liberación de Cdc14 del nucleolo y la segregación de núcleos, tomadas mediante epifluorescencia indirecta en muestras fijadas de la cepas *GAL1-ESP1* y el mutante *GAL1-ESP1 sak1-G150A*. Las células se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 4h a 25 °C, cuando las células estuvieron paradas se adicionó 2% galactosa, sin liberar de metafase.



Figura R29. La expresión ectopica de la separasa en el mutante *sak1-G150A* en ausencia de Cdc20 da lugar a la progresión en mitosis y salida a G₁. La cepas *GAL1-ESP1*, el mutante *GAL1-ESP1 Δsak1* y el mutante *GAL1-ESP1 sak1-G150A* se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 4h a 25 °C, una vez paradas las células se adicionó 2% galactosa, sin liberar de metafase. A) La observación de la liberación de Cdc14 del nucleolo y la elongación del huso mitótico se realizó mediante inmunoifluorescencia, al menos 100 células fueron contadas en cada capa. B) El contenido en ADN y la segregación cromosómica se analizó mediante citometría de flujo.

Complementariamente, para obtener más información acerca del fenotipo del mutante *sak1-G150A* bajo la sobreexpresión ectópica de la separasa, estudiamos diferentes marcadores de mitosis, como Pds1, Clb2 y Sic1, a lo largo de la mitosis en cepas control, mutante $\Delta sak1$ y mutante *sak1-G150A* que expresan de forma ectópica el gen *ESP1* bajo el promotor inducible por galactosa *GAL1* etiquetado con el epítopo FLAG y la proteína Scc1, Pds1 y Sic1 etiquetada con el epítopo HA. Los resultados se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos que reconocen el epítopo FLAG y HA, y específicamente la proteína Clb2 y Pgk1. En el caso de las células paradas en la transición metafase-anafase debido a la depleción del coactivador Cdc20, no se puede activar APC, por lo que no podrá llevarse a cabo la degradación de la proteína Clb2 y Pds1. Como se puede observar en la figura R30, en la cepa salvaje dónde se expresa ectópicamente la separasa *GAL1-ESP1* Asak1, no se degradan las proteínas Clb2 y Pds1 (Fig. R30). También, podemos observar en los resultados que como consecuencia directa al

no degradarse Pds1, pese a la expresión ectópica de la separasa, el corte del complejo cohesina es inferior a lo esperado para estos niveles de la separasa (Fig. R30). Además, la expresión ectópica de separasa es suficiente para que se libere Cdc14 y elongue el huso mitótico, pero no para salir de mitosis (Fig. R28 y R29). El principal inhibidor de Cdc28, Sic1, también se acumula como consecuencia de la activación de Cdc14, pero sin degradarse ya que las células no salen de mitosis en las cepas*GAL1-ESP1 y GAL1-ESP1 Asak1* (Fig. R30). Por el contrario, en el mutante *sak1-G150A* bajo la expresión ectópica de la separasa, sí degrada Clb2 y Sic1 y muestra unos niveles más altos de corte del complejo cohesina comparados con la cepa *GAL1-ESP1*, sin que haya una degradación notable de Pds1 (Fig. R30). Los principales marcadores proteícos de salida de mitosis indican en conjunto que el mutante *sak1-G150A* bajo la expresión ectópica de la mitosis. Estos resultados concuerdan con los datos aportados por microscopía (Fig. 28 y R29B) y citometría de flujo (Fig. R29B), dónde el mutante *GAL1-ESP1 sak1-G150A* es capaz de salir de mitosis y comenzar una nueva ronde del ciclo celular, saliendo a G₁.



Figura R30. La expresión ectópica de la separasa en el mutante *GAL1-ESP1 sak1-G150A* sale de mitosis. Los niveles proteicos de la separasa se analizaron con el anticuerpo α-FLAG, para Scc1, Pds1 y Sic1 se analizaron con el anticuerpo α-HA, para Clb2 con un anticuerpo α-Clb2 y para Pgk1 con un anticerpo α-Pgk1. Las cepas *GAL1-ESP1, GAL1-ESP1 Δsak1 y GAL1-ESP1 sak1-G150A* se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 4h a 25 °C, cuando las células estuvieron paradas se adicionó 2% galactosa, sin liberar de metafase. Los niveles de Pgk1 se usaron como control de carga.

A PANDANDANDANDANDAN

Con el paso del tiempo y los estudios publicados, la lista de las proteínas que interactúan físicamente con la separasa va incrementándose: la securina, la cohesina, Cdc28, Clb2, Slk19, Cdc5, Cdc55, Zds1 (Uhlmann et al., 2000; Sullivan and Uhlmann, 2003; Rahal and Amon, 2008; Queralt and Uhlmann, 2008; Lianga et al., 2018). Pese a contar con esta lista de interactores tan importantes en el desarrollo de la mitosis, aún quedan incógnitas en esta red de interacciones de la separasa para poder tener una explicación completa a todas las funciones que lleva a cabo y su regulación. En capítulos previos, hemos demostrado que SAK1 y ESP1 interaccionan genéticamente. Por otro lado, nuestros datos sugieren que la posible interacción funcional entre Sak1 y Esp1 no ocurre a través de la vía de señalización de Snf1. Estos resultados dejan abierta la posibilidad a que Sak1 y Esp1 interactúen directamente. El momento de mayor actividad y función de separasa es durante la mitosis (también meiosis), por lo que para estudiar la relación funcional entre Sak1 y Esp1 estudiamos la interacción física entre estas dos proteínas a lo largo de la mitosis. Para ello, realizamos ensayos de coinmunoprecipitación, utilizando una cepa que contenía la proteína Sak1 sobreexpresada y etiquetada con el epítopo TAP (*Tandem* Affinity Purification) y la proteína Esp1 etiquetada con el epítopo HA. Como control negativo del experimento se utilizó una cepa que no tenía Sak1 etiquetado. Las células se sincronizaron en la transición metafase-anafase mediante la depleción y reintroducción de Cdc20, luego las células son recogidas en metafase y tras 20 minutos de la liberación, cuando las células se encuentran en anafase. Tras recoger todas las muestras, se prepararon los extractos proteicos en condiciones nativas y se inmunoprecipitó Sak1-TAP utilizando la resina IgG-agarosa. Las muestras de la coinmunoprecipitación se analizaron mediante Western blot y se comprobó que al inmunoprecipitar Sak1-TAP se copurifica Esp1-HA tanto en metafase como en anafase. Además, se aprecia que hay una Esp1-HA copurifica con Sak1-TAP de forma más eficiente en anafase (Fig R31). Por tanto, Sak1 y Esp1 interaccionan físicamente durante la mitosis, en condiciones de sobreexpresión de SAK1, siendo más fuerte la interacción durante la anafase.

Para comprobar si la interacción física entre Sak1 y Esp1 también se produce con la expresión de *SAK1* de forma endógena, se repitieron los experimentos de coinmunoprecipitación con cepas que contenían la proteína Sak1 endógena etiquetada con el epítopo V5 (*P and V proteins of the paramyxovirus*) y la separasa etiquetada con HA. Una cepa sin etiquetar Sak1 se usó como control negativo de la inmunoprecipitación. Adicionalmente, se incluyó en el experimento una cepa del mutante sencillo *sak1-G150A* etiquetado con el epítopo V5 y la separasa con HA para estudiar la interacción física con la separasa y la proteína supresora *sak1-G150A*. Los extractos proteicos obtenidos de



Figura R31. La separasa coinmunoprecipita junto a Sak1 durante la metafase y con myor interacción en la anafase. La cepa 2µm p*SAK1 ESP1-HA (control) y la cepa* 2µm p*SAK1*-TAP *ESP1-HA* se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 4h a 25 °C, posteriormente se liberaron mediante la reintroducción de Cdc20 y se tomaron muestras en metafase y anafase. Sak1 se inmunoprecipitó usando la resina IgG agarosa. La coinmuninoprecipitación se analizó para Esp1-HA usando el anticuerpo α -HA y para Sak1-TAP el anticuerpo α -PAP. El análisis estadístico se realizo con n=4. *=p<0,05 y ** =p<0,01.



Figura R32. La separasa coinmunoprecipita junto a Sak1 con mayor intensidad en el mutante sak1-G150A. La cepa *ESP1*-HA (control), la cepa *SAK1*-V5 *ESP1*-HA y la cepa sak1-G150A-V5 *ESP1*-HA se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 4h a 25 °C. Una vez lás células se encontaron paradas se recogieron las muestras. Sak1 se inmunoprecipitó usando el anticuerpo α-V5 y proteína-A dynabeads. La coinmuninoprecipitación se analizó para Esp1-HA usando el anticuerpo α-HA y para Sak1-V5 el anticuerpo α-V5. El análisis estadístico se realizo con n=4. *=p<0,05 y ** =p<0,01.

las muestras se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo α-V5 y posteriormente con proteína A *dynabeads*. Los resultados analizados mediante *Western blot* mostraron que, de forma similar al experimento anterior, al inmunoprecipitar Sak1-V5 endógeno se copurificó Esp1-HA en todos los tiempos analizados. Además, los resultados del mutante sencillo *sak1-G150A* muestran que interacciona con Esp1 con mayor intensidad que Sak1 salvaje (Fig. R32). Tomando en conjunto todos estos resultados nos indican que Sak1 y Esp1 interaccionan físicamente en mitosis, con mayor predominancia en anafase; y con mayor intensidad con la proteína mutante *sak1-G150A*.

A DAMPAN PAN PAN PAN PAN PAN

4.13. Sak1 FOSFORILA A LA SEPARASA IN *VITRO E IN VIVO*.

En el ensayo con la expresión ectópica de la separasa confirmamos que la relación funcional entre la separasa y Sak1 no se produce porque Sak1 sea sustrato proteolítico de la separasade la separasa. Ahora, gracias a los resultados de la coinmunoprecipitación de Sak1, sabemos que la interacción entre Sak1 y la separasa se produce físicamente durante la mitosis. Puesto que parece existir una interacción entre Sak1 y la separasa, pero no parece que la separasa actúe proteolíticamente sobre Sak1, la posibilidad lógica sería que Sak1 actuara sobre la separasa en mitosis. Sak1 es una serín treonín quinasa cuyo principal sustrato es Snf1 (Nath, McCartney and Schmidt, 2003). La fosforilación de Sak1 en la treonina T210 del *loop* de activación de Snf1, regula la activación de Snf1, promoviendo un cambio conformacional en su estructura y dejando accesible el centro activo de Snf1 (McCartney et al., 2016). En este caso, cómo la interacción se produce directamente entre Sak1 y la separasa, nuestra hipótesis es que Sak1 podría estar fosforilando directamente a la separasa. Para comprobar si la separasa es sustrato de Sak1, realizamos un ensayo quinasa midiendo los niveles de fosforilación de la separasa en presencia de Sak1. Usamos como sustrato la proteína separasa expresada ectópicamente en GAL1-ESP1-FLAG y purificada de S. cerevisiae. Para el ensayo quinasa se usó la proteína Sak1 y sak1-G150A etiquetadas con el epítopo V5 e inmunoprecipitadas de cultivos asincrónicos, mediante un anticuerpo que reconoce específicamente el epítopo V5 y su posterior incubación con proteína A dynabeads. El ensayo quinasa fue realizado *in vitro*, en presencia del isótopo marcado, ³²P, para poder medir los niveles de de fosfato incorporado en el sustrato. Los niveles de ³²P obtenidos del ensayo in vitro en presencia de Sak1 y sak1-G150A muestran una señal correspondiente a la proteína fosforilada en ambos casos (Fig. R33). Comparando los niveles de ³²P incorporado entre las muestras en presencia de Sak1 salvaje y la proteína sak1-G150A, se observa un incremento de los niveles de fosforilación con la proteína sak1-G150A como enzima de la reacción quinasa. El análisis de estos resultados nos muestra que Sak1 fosforila *in vitro* a la separasa y que presenta un incremento de los niveles de fosforilación con la proteína *sak1-G150A*. Por lo que Sak1 podría estar regulando la actividad de la separasa mediante fosforilación.



Figura R33. Sak1 fosforila a la separasa *in vitro.* Se recogieron muestras de cultivos asincrónicos de las cepa *ESP1*-HA (control), la cepa *SAK1*-V5 *ESP1*-HA y la cepa *sak1-G150A*-V5 *ESP1*-HA. Sak1 se inmunoprecipitó usando el anticuerpo α -V5 y proteína-A dynabeads. Los niveles de proteína de Esp1-FLAG se analizaron usando el anticuerpo α -FLAG y para Sak1-V5 el anticuerpo α -V5. La fosforilación de separasa se determinó mediante autoradiografia. El análisis estadístico se realizo con n=8. *=p<0,05 y ** =p<0,01.

4.13.1. LA AUSENCIA DE Sak1 DISMINUYE LOS NIVELES DE LA SEPARASA FOSFORILADA *IN VIVO***.**

Al comprobar que la interacción entre Sak1 y la separasa *in vitro* se da a través de la función quinasa de Sak1, confirmamos que la dirección en la interacción de estas dos proteínas era de Sak1 hacía la separasa. El hecho de que la separasa sea sustrato de Sak1 es algo bastante factible ya que está descrito que la separasa es sustrato de otra quinasa, el complejo Cdc28-Clb2 en *S. cerevisiae* (Lianga *et al.*, 2018) y Cdk1-ciclina B2 en células humanas (Stemmann *et al.*, 2001), aunque con diferente regulación y función en cada organismo. Así mismo, el resultado de que la separasa mostrara un mayor grado de fosforilación por la proteína mutante *sak1-G150A* nos hizo pensar en la posibilidad de que los resultados obtenidos en los fenotipos de los diferentes mutantes de Sak1 estuvieran determinados por la fosforilación que lleva a cabo Sak1 sobre la separasa. Para comprobar la fosforilación de la separasa por Sak1 *in vivo* y poder

obtener más información y también, poder relacionar los fenotipos de los diferentes mutantes de *sak1* con la fosforilación de la separasa decidimos estudiar la fosforilación de la separasa *in vivo* mediante la utilización de la molécula de Phos-tag. El análisis de proteínas fosforiladas mediante *Western Blot* con geles con Phos-tag consiste en una técnica de electroforesis, en la cual se produce la separación de las proteínas fosforiladas de las no fosforiladas, debido a la unión del grupo fosfato de las proteínas fosforiladas a las moléculas de Phos-tag, esto aumenta el tamaño del complejo formado, retardando la migración de las formas fosforiladas. La resolución y patrón de bandas que se obtiene con esta técnica difiere para cada proteína, varía en función del número total de residuos de serina, treonina o tirosina fosforilados, incluso de su posición en la estructura de la proteína. Esta técnica permite el análisis cualitativo y cuantitativo de las proteínas fosforiladas resueltas a diferentes alturas en los geles de Phos-tag.

Para analizr la fosforilación de la separasa *in vivo* en los mutantes Δsak1 y sak1-G150A se realizó el estudio de la fosforilación mediante Western blot con geles de Phos-tag. La inmunoprecipitación de la separasa se llevo a cabo en cultivos asincrónicos de la cepa tipo salvaje, el mutante $\Delta sak1$ y el mutante sak1-G150A que expresan la separasa endógena etiquetada con el epítopo HA. Los extractos proteicos de estas tres cepas se incubaron con el anticuerpo que reconoce el epítopo HA durante 1h y posteriormente con proteína A dynabeads. Las muestras de la inmunoprecipitación de la separasa se analizaron mediante Western blot con geles de Phos-tag para la resolución en diferentes bandas correspondientes a diferentes estados de fosforilación de la separasa. El análisis de las diferentes bandas de fosforilación de la separasa nos muestra la presencia de dos bandas: una banda superior, correspondiente a la porción de la separasa fosforilada y una banda inferior, perteneciente a la separasa no fosforilada. En los resultados del mutante $\Delta sak1$ se observa un incremento de la banda inferior (no fosforilada) respecto a la banda superior (fosforilada), comparado con las bandas de la muestra de la cepa salvaje (Fig. F34). En el mutante sak1-G150A hay un aumento de la banda correspondiente a la separasa fosforilada respecto a la banda de la separasa no fosforilada (Fig 34). Los resultados aportados en este experimento, junto con los resultados obtenidos del análisis de la fosforilación in vitro, nos muestran que Sak1 actúa como quinasa fosforilando a la separasa.



UD

Figura R33. Reducción de la fosforilación de separasa en ausencia de Sak1 Se recogieron muestras de cultivos asincrónicos de las cepa *ESP1*-HA (control), la cepa *Δsak1 ESP1*-HA y la cepa *sak1-G150A ESP1*-HA. Esp1 se inmunoprecipitó usando el anticuerpo α-HA y proteína A *dynabeads*. El análisis de la separasa fosforilada se realizó mediante *Western blot* con geles con y sin Phos-tag, los niveles proteícos de la separasa se analizaron utilzando el anticuerpo α-HA. Para el cálculo del ratio de separasa fosforilada entre las diferentes cepas, se cuantificó la cantiadad de separasa fosforilada (banda superiror, Esp1-P) respecto a la cantidad de separasa no fosforilada (banda inferior, Esp1).

4.14. Sak1 REGULA LA LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE LA SEPARASA EN MITOSIS.

La localización de las proteínas dentro de la célula juega un papel clave en el desarrollo de sus funciones, sobre todo cuando desarrollan su actividad en un determinado orgánulo de la célula. En muchos casos, las modificaciones postrasduccionales de las proteínas tienen como fin regular su localización subcelular, ya sea promoviendo su transporte mediante señales de localización o unión a otras proteínas transportadoras, o mediante la retención en algún orgánulo hasta su liberación. Debido al gran peso que tiene la localización subcelular de la separasa en el desarrollo de sus funciones, ya que todos sus sustratos conocidos se encuentran en el núcleo durante la mitosis (Ulhmann et al., 2000; Nagao et al., 2004; McAleenan et al., 2013; Kim et al., 2015; Maier, Lampson and Cheeseman, 2021), quisimos comprobar si existían alteraciones en su localización subcelular en los diferentes mutantes de SAK1. La localización de la separasa, tanto en células humanas como en levaduras, está determinada mayoritariamente por su principal su principal regulador, la securina (Ciosk et al., 1998; Jensen et al., 2001; Stemmann et al., 2001; Hornig et al., 2002; Agarwal and Cohen-Fix, 2002). Al final de la fase G₁ los niveles de las separasa en el núcleo empiezan a incrementarse hasta alcanzar su máximo al inicio de la mitosis. Esta descrito como este incremento coincide en el tiempo con la síntesis de nueva securina y está ampliamente demostrado la relación funcional separasa-securina, pero se desconoce como la securina transporta a la separasa desde el citoplasma hasta el núcleo (Jensen *et al.*, 2001; Stemmann *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2002; Agarwal and Cohen-Fix, 2002; Baskerville *et al.*, 2008; Holt *et al.*, 2008; Holt *et al.*, 2008; Holland and Taylor, 2008). Como ocurre con el resto de mecanismos de regulación de la separasa, la célula dispone de diferentes reguladores para asegurarse el perfecto control de la separasa y sus funciones. En la regulación de la localización subcelular de la separasa hay evidencias para pensar que existe otros mecanismos aún por descubir. Esto se pone de manifiesto en los mutantes de la securina, dónde la separasa sigue localizándose en el núcleo (aunque disminuyen sus niveles) pese a la ausencia de la función de la securina (Yamamoto *et al.*, 1996; Alexandru *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 2001; Hornig *et al.*, 2002; Khondker et al., 2020).

Para estudiar si la función de Sak1 regulando a la separasa pudiera promover cambios en la localización subcelular de la separasa, llevamos a cabo un análisis de los cambios de localización de la separasa mediante una cuantificación in vivo de la proteína Esp1 en toda la célula. Para poder realizar este análisis se prepararon cepas tipo salvaje que expresan la proteína Htb2 marcada con la proteína fluorescente mCherry y la proteína Esp1 con la proteína fluorescente EGFP los mutantes $\Delta sak1$, sak1-G150A y $\Delta pds1$ que expresan la proteína Esp1 marcada con la proteína fluorescente EGFP. El análisis de los cambios de la localización de Esp1 se llevó a cabo en experimentos de intervalos de tiempo in vivo mediante microscopia de epifluorescencia en cultivos celulares sincronizados en mitosis, mediante la adición y reintroducción de Cdc20. Para poder monitorizar la progresión en mitosis se tomo como referencia la señal de la proteína nuclear Htb2 (mCherry) y la propía señal de la separasa (EGFP). Adicionalmente al análisis individual de cada cepa por separado, para cuantificar de forma más asjustada los posibles cambios de localización e intensidad de la señal de la separasa mezclamos las diferentes cepas a analizar en grupos de dos. La determinación de la localización subcelular de la separasa la realizamos mediante el ratio núcleo/citoplasma de la señal cuantificada de la separasa (EGFP). Si el ratio es inferior a uno, indica que la localiación es más predominante en el citoplasma. Si el ratio es cercano a uno, la localización es similar entre el núcleo y el citoplasma. Si el ratio es superior a 1,5 la localización es predominante en el núcleo.

Los resultados obtenidos de la localización subcelular de la separa en el estudio de progresión en mitosis *in vivo*, nos muestran como en una cepa salvaje a tiempo 0 la señal de la separasa (EGFP) está predominantemente en el núcleo. Una vez la señal de los núcleos lobulados se observa dividida en cada una de las células, anafase temprana, (15 a 20 minutos aprox.), se aprecia una disminución del ratio núcleo/citoplasma de la señal de la separasa. Después, transcurridos entre 30 a 40 minutos tras la liberación de la parada en metafase (anafase tardía), el ratio núcleo/citoplasma disminuye hasta

RESULTADOS

niveles cercanos o inferiores a 1 (Fig R35). En el caso del mutante Δpds1, el ratio núcleo/ citoplasma de la señal de la separasa se aprecia ligeramente reducido en comparación con la cepa salvaje, como se describe en la bibliografía, y acaba disminuyendo de forma similar a la cepa salvaje durante la anafase (Fig R35). En cambio, en el mutante *Asak1* desde tiempo 0 apenas se aprecia señal de la separasa en el núcleo de la célula y el ratio núcleo/citoplasma de la señal de la separasa se reduce un 20% y disminuye al final de mitosis de forma similar a la cepa salvaje. Por último, en el mutante sak1-G150A el ratio núcleo/citoplasma de la señal de la separasa es ligeramente superior al ratio observado en la cepa salvaje a tiempo 0, y en los tiempos posteriores no se observan diferencias con la cepa salvaje (Fig R35). Estos resultados nos muestran que el mutante sak1-G150A presenta una mayor localización nuclear de la separasa al inicio de la mitosis comparado con una cepa salvaje y la asuencia de Sak1 en el mutante $\Delta sak1$ ocasiona una disminución de la localización nuclear de la separasa al inicio de la mitosis, incluso menor que en el mutante Δpds1. Los resultado obtenidos sugieren que Sak1 podría regular la localización subcelular de la separasa en mitosis.

ADAMPANDAMPANDAMPANDAMPANDA



Figura R35. El mutante supresor sak1-G150A muestra una mayor localización nuclear de la separasa al inicio de la mitosis, mientras que el mutante de deleción $\Delta sak1$ presenta una disminución de la localización nuclear de la separasa. Para el estudio de la localización subcelular de la separasa se usó una cepa salvaje y en el mutante $\Delta pds1$ que expresan las proteína endógenas Esp1 marcada con la proteína fluorescente EGFP y Htb2 maracada con la proteína fluorescente mCherry, y los mutantes *Asak1* y *sak1-G150A* que expresan la proteína endógena Esp1 marcada con la proteína fluorescente EGFP. Las células se pararon en metafase mediante la depleción de Cdc20 durante 4h a 25 °C, posteriormente se liberaron de forma sincronizada a anafase mediante la reintroducción de Cdc20. A) Análisis de la localiazación subcelular de la separasa mediante el ratío de la señal de la separasa-EGFP nuclear, respecto a la señal de la separasa-EGFP citoplasmática en metafase, anafase temprana y anafase tardía. La gráfica muesta la medía para el ratio EGFP nuclear/EGFP citoplasmático y la desviación estándar para cada tiempo. Se analizó un mínimo de 10 células para cada cepa. *=p<0,05 y ** =p<0,01. B) Imágenes representativas de la localización subcelular de la separasa en metafase, anafase temprana y anafase tardía, tomadas mediante microscopía de epifluorescencia confocal en muestras in vivo. Los cultivos, se mezclaron de dos en dos para disminuir la variabilidad en la comparación de cuantificación de la señal de Esp1- EGFP. Se utilizó la señal Htb2-mCherry para distinguir la cepa salvaje o el mutante $\Delta pds1$ en los cultivos dónde se mezclaron las cepas.


J

144

RESULTADOS

145



DISCUSIÓN



Desde la primera referencia a la separasa, en el estudio de 1988 por Baum y sus colegas, hasta la fecha actual de esta tesis, los avances en el conocimiento sobre la separasa, como tantos otros descubrimientos clave para entender la biología de los seres vivos, han ido progresando "a hombros de gigantes". Aun así, la tremenda complejidad que entraña el proceso de la división celular y la mitosis lleva implícito un largo camino por recorrer porque, aunque algunos aspectos clave han sido satisfactoriamente dilucidados, muchas preguntas quedan aún por responder. Una de las formas más eficaces con las que se empezó a investigar los diferentes componentes del ciclo celular fue aislando mutantes en rastreos genéticos con la levadura de fisión S. pombe. Paul Nurse y Kim Nasmyth llevaron a cabo dos estudios donde se aislaron 86 mutantes y se consiguió identificar 24 genes que pasaron a formar parte de toda la base del estudio del ciclo celular de los años posteriores (Nurse et al., 1976; Nasmyth and Nurse, 1981). Otra de las aproximaciones para entender el funcionamiento del ciclo celular fue el uso de mutantes cdc termosensibles en S. cerevisiae, mediante los cuales se pudieron identificar nuevos mecanismos reguladores de la célula o las propias Cdks, motores del ciclo celular (Hartwell, Culotti and Reid, 1970; Hartwell et al., 1973). La importancia de estas investigaciones se vio reflejada con la entrega del premio Nobel de Medicina y Fisiología a Lee Hartwell, Paul Nurse y Tim Hunt en 2001 por sus descubrimientos sobre las Cdks y las ciclinas, como reguladores claves del ciclo celular.

TRANSPORTED TRANSPORTED TO TRANSPORTED T

La separasa, al igual que ocurrió con muchos otros mutantes *cdc*, también se identificó por primera vez en un rastreo genético en el cual se aisló el mutante *esp1-1 (extra spindle poles*), denominado así porque presenta más de dos cuerpos polares del huso (Baum *et al.*, 1988). Las mejoras en las diferentes técnicas de investigación, sumado a la transcendencia que presentan los estudios de las alteraciones del ciclo celular, dieron lugar a nuevos avances en el estudio de la separasa permitiendo comprender mejor los mecanismos moleculares de la segregación cromosómica. La mitosis es uno de los eventos con más relevancia en el ciclo celular, ya que errores en este proceso o mutaciones en alguno de los componentes que lo regulan pueden desencadenar una segregación cromosómica aberrante, lo que en muchos de los casos se traduce en pérdida de la integridad genómica, desencadenando algún tipo de cáncer u otros trastornos como abortos, defectos en el desarrollo o incluso enfermedades neurodegenerativas. Por lo que entender en su conjunto los mecanismos y la regulación que rodea a la separasa, sigue siendo hoy en día crucial e indispensable para abrir la puerta a nuevas técnicas y tratamientos frente a multitud de patologías.

Esta tesis se inició buscando aislar nuevos mutantes supresores de la separasa en un rastreo genético, con la finalidad de encontrar nuevos genes relacionados con el ciclo celular y más específicamente, con la separasa. Los estudios genéticos para la identificación de supresores se basan en la aleatoriedad de la aparición de nuevas mutaciones que reviertan la mutación original, es decir, se necesita una buena dosis de serendipia para obtener resultados. También, es importante el comportamiento casi "tumoral" de las células de levadura mutantes, dónde los mutantes más afectados en la progresión del ciclo celular o mueren o acaban "acumulando" nuevas mutaciones apareciendo alguna mutación supresora que les confieren alguna ventaja en su supervivencia y les permiten seguir dividiéndose. Al final, también es necesaria una dosis de paciencia y curiosidad para caracterizar fenotípicamente los mutantes supresores aislados y encontrar alguna característica que marque la diferencia.

ADAMPANDANDANDAN

Debido a que el gen *ESP1* es un gen esencial para la célula, para poder entender mejor la funciones y las posibles relaciones de la separasa se ha recurrido al uso de diferentes mutantes condicionales, normalmente mutantes termosensibles, que mostraban diferentes grados de alteración en las funciones proteolítica y no proteolítica de la separasa a temperaturas restrictivas. Uno de los primeros mutantes termosensibles de la separasa descubiertos fue *esp1-1* (Baum *et al.*, 1988), que presenta la mutación P1404L, muy cerca del sitio activo (C1531) y muestra letalidad a temperaturas semirestrictivas (34 °C), lo que afecta en gran medida al corte de Scc1, aunque sigue manteniendo cierta actividad proteolítica (Uhlmann, Lottspeich and Nasmyth, 1999; Uhlmann et al., 2000; Baskerville, Segal and Reed, 2008). Otro de los mutantes más usados es la sobreexpresión del alelo mutante *esp1-C1531A*, que tiene mutada la cisteína 1531 del sitio catalítico (Lin, Lou and Yu, 2016; Luo and Tong, 2017) quedando la separasa catalíticamente inactiva. Aunque este mutante no se puede expresar a niveles endógenos porque es letal, la sobreexpresión del mutante *GAL1-esp1-C1531A* en una cepa salvaje en células paradas en metafase, es capaz de promover la activación de Cdc14, pero ni se produce la escisión de Scc1 ni la elongación del huso mitótico, por lo que no hay segregación cromosómica (Uhlmann et al., 2000; Sullivan and Uhlmann, 2003; Horning and Uhlmann, 2004; Mendoza *et al.*, 2009). Este mutante es una de las pocas estrategias posibles para poder estudiar por separado la función no proteolítica de la separasa. El tercero de los mutantes más utilizado y el que nosotros hemos utilizados en este trabajo es el mutante termosensible *esp1-2*. La elección de este mutante se debe a que es el que más severamente ve afectadas todas las funciones promovidas por la separasa. El mutante *esp1-2* porta la mutación A701C y se desconoce la implicación que tiene sobre la estructura de la separasa, pero este mutante ya presenta un crecimiento ligeramente más lento a temperaturas no restrictivas (25 °C) y ve gravemente afectado su crecimiento a temperaturas semirestrictivas (28 $^{\circ}$ C) y totalmente a temperaturas restrictivas (>32°C).

Del rastreo genético para identificar nuevos mutantes supresores del alelo termosensible de la separasa *esp1-2* aislamos diferentes mutantes supresores de *esp1-2* capaces de crecer a temperaturas semirestrictivas, pero ninguno a temperaturas restrictiva de 37 ºC. Este hecho remarca la importancia y la estrictica regulación de la separasa, ya que resulta muy difícil suprimir por completo la actividad de esta proteína clave para la división celular. Desde un punto de vista farmacológico, esto implica dos puntos positivos a favor de la investigación sobre fármacos que inhiban la actividad de la separasa destinados a enfermedades como el cáncer. El primero es que la inhibición de la separasa es muy difícil de suprimir, por lo que un compuesto que sea capaz de inhibir la actividad de la separasa o su expresión en células dónde se encuentre alterada, como ocurre en algunos tumores, no desarrollará resistencias fácilmente o verá disminuida su función por otras posibles mutaciones en otras vías de la célula. El segundo punto positivo, es la extrema importancia de las funciones que promueve la separasa, por lo que su inhibición, aunque sea parcial, acabaría desencadenando una catástrofe mitótica y la muerte de la célula. Por otro lado, hay que ser conscientes de una desventaja clara: al ser una proteína esencial, el fármaco también tendría un efecto adverso sobre las células dónde separasa no estuviera alterada, por lo que su uso sería más efectivo sólo en los tumores en los que la separasa está sobreexpresada (Meyer et al., 2009; Mukherjee et al., 2011; Zhang and Pati, 2013; Mukherjee et al., 2014; Zhang and Pati, 2017). Esta idea sobre la búsqueda de inhibidores de la separasa no es ninguna novedad, ya en el año 2000 se publicó una patente para un método de identificación de nuevos inhibidores de las separasa (Inhibitors of separase, method for identifying them and uses, 2000) y se identificó una pequeña molécula, Sepin-1 (Pati and Zhang, 2013; Zhang et al., 2014; Zhang and Pati, 2018) como inhibidor de la separasa y posible candidato a fármaco antitumoral. Aunque también se han estudiado otras moléculas inhibidoras de la separasa, como SIC5-6 (Henschke et al., 2019), ningún compuesto relacionado con la inhibición de la separasa ha llegado a ensayos clínicos.

En esta tesis doctoral, la primera aproximación al estudio de los mutantes supresores candidatos fue la validación de que el fenotipo supresor de *esp1-2* se debía únicamente a la mutación supresora candidata *vhs1-C1161T*, *pah1-C549T* y *sak1-G150A*, respectivamente. Después de cruzar 3 veces las cepas mutantes supresoras con una cepa salvaje y analizar la descendencia se concluyó que, el fenotipo supresor de la cepa α -7 no se debe, al menos no exclusivamente, a la mutación *vhs1-C1161T* (Fig. R1). Por otro lado, la reversión de la mutación al alelo control (*vhs1*-T1161C) en la cepa α -7 mediante edición génica con CRISPR no revirtió el fenotipo supresor. La cepa α -7 (*esp1-2 vhs1-C1161T*) es uno de los mutantes supresores que más recuperaba el fenotipo del alelo termosensible de *esp1-2* a temperatura semirestrictiva. Las conexiones del gen *VHS1* con el complejo de RENT (Breitkreutz *et al.*, 2010) y la posibilidad de ser una quinasa que fosforile directamente

a la separasa lo postulaban como candidato especialmente atractivo para un estudio en mayor profundidad. Sin embargo, no descartamos que *VHS1* pueda ser un posible interactor de la separasa y que el fenotipo supresor identificado pudiera deberse a la suma de varias mutaciones en otros genes en combinación a la mutación *vhs1-C1161T*. En el caso de las cepas a-5 y α -30 sí fuimos capaces de validar satisfactoriamente el fenotipo supresor de *esp1-2* con las mutaciones supresoras *pah1-C549T* y *sak1-G150A*, por lo que continuamos el estudio con ellas.

ADDINIDAN DAN DAN DAN DAN DAN

5.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE PAH1.

La función de Pah1 como fosfatasa en la regulación de la síntesis de la membrana nuclear durante la mitosis y su posible relación con la separasa, podría ampliar la lista de funciones clave reguladas por la separasa (Santos-Rosa et al., 2005; Karanasios et al., 2010; Henry et al., 2012; Barbosa et al., 2015). El resultado obtenido en las interacciones genéticas con la expresión ectópica de PAH1 en el mutante esp1-2 no muestra una recuperación del fenotipo supresor (Fig. R3 y R4). La ausencia de cambio en el crecimiento del mutante esp1-2 GAL1-PAH1 se puede explicar porque la fosfatasa Pah1 se encuentra constitutivamente inactiva en el citosol, por lo que un aumento de los niveles de la proteína Pah1 inactiva no repercuten en la función de Pah1 en la síntesis de fosfolípidos. De igual forma, en el mutante doble $\Delta pah1 esp1-2$ tampoco se aprecia un cambio en el crecimiento respecto al mutante sencillo esp1-2. Estos dos resultados en conjunto nos indican que, ambos genes podrían actuar en la misma ruta de señalización. Para poder entender mejor la interacción genética entre ESP1 y PAH1, utilizamos la sobreexpresión de la forma constitutivamente activa GAL1pah1-7A, para estudiar el efecto de la proteína Pah1 activa en el mutante esp1-2, y la sobreexpresión de la forma catalíticamente inactiva GAL1-pah1-2A para estudiar el efecto de tener Pah1 inactiva junto con el alelo termosensible *esp1-2*. En el mutante esp1-2 GAL1-pah1-7A se reduce el crecimiento a temperatura semirestrictiva al tener la proteína constitutivamente activa, respecto al mutante esp1-2 (Fig. R3). Pensamos que esto podría ser debido a que la actuación continuada de la fosfatasa Pah1 estaría repercutiendo en una disminución de la biogénesis de membrana, necesaria para el correcto desarrollo de la mitosis en organismos con una mitosis cerrada, como S. cerevisiae (Sazer et al., 2014; Barbosa et al., 2015). Por otro lado, en el mutante esp1-2 GAL1-pah1-2A la sobreexpresión de la proteína Pah1 catalíticamente inactiva también reduce el crecimiento respecto al mutante *esp1-2*, a temperatura semirestrictiva (Fig. R4). En este caso, pese a que no se ha eliminado la presencia de la proteína Pah1 endógena, la sobreexpresión de la proteína *pah1-2A* podría estar desplazando a la proteína Pah1 endógena, dando lugar a un incremento en el fenotipo de termosensibilidad.

Hasta el momento, la mayoría de los estudios realizados para entender la función de Pah1 en la regulación de la biogénesis de membrana se han realizado en condiciones de escasez de nutrientes, dónde la falta de glucosa activaría los mecanismos en la célula, como es la activación de la vía de Pah1 para desplazar la biosíntesis de nueva membrana a la formación de gotas lipídicas, para hacer frente a la falta de nutrientes (Santos-Rosa et al., 2005; Sazer et al., 2014; Barbosa et al., 2015). Ninguna de las dos interacciones genéticas estudiadas, pah1-7A o pah1-2A con esp1-2, coincide con el resultado obtenido del mutante supresor *esp1-2 pah1-C549T*, por lo que no podemos concluir si la mutación C549T es activadora o inhibidora de Pah1. Lo que sí observamos es un agravamiento del fenotipo de termosensibilidad con la sobreexpresión de *pah1-2A* en el mutante *esp1-2*, lo que podría sugerir una interacción entre Pah1 activa con separasa en un ciclo celular no alterado. Por ende, Pah1 y la separasa estarían llevando a cabo una regulación en la biosíntesis de membrana, sin la necesidad de la activación de esta vía por ausencia de glucosa. En el futuro, se debería realizar un estudio más en profundidad para investigar la relación funcional entre separasa y Pah1. Por un lado, sería interesante estudiar las interacciones genéticas entre la mutación supresora pah1-C549T con las mutaciones pah1-2A y pah1-7A para obtener más información sobre la mutación C549T en la función de Pah1 (ganancia o pérdida de función), y como afecta este cambio de función en su relación con la separasa. De forma complementaria, para ayudar a entender la mutación C549T en el desarrollo de la actividad de Pah1, sería conveniente estudiar los niveles de fosforilación de Pah1 en una cepa control en el mutante doble esp1-2 pah1-C549T en células sincronizas, a lo largo del ciclo celular y más específicamente durante la mitosis. También, se podría estudiar la actividad enzimática de Pah1 mediante la adaptación e implementación de biosensores de ácido fosfatídico (PA) y diacil-glicerol (DAG) utilizados en estudios publicados recientemente (Romanauska and Köhler, 2018; Yamada et al., 2020). Otras vías por explorar, es comprobar mediante ensayos de corte de la separasa, si Pah1 pudiera ser sustrato de la actividad proteolítica de la separasa y comprobar si existe una interacción proteína-proteína mediante ensayos de coinmunoprecipitación, para ayudar a entender si hay una regulación directa o indirecta entre Pah1 y la separasa.

Debido al papel de Pah1 en la biosíntesis de membrana nuclear y que el mutante $\Delta pah1$ presenta defectos en la estructura de la membrana nuclear, tales como un aumento de la superficie de la propia membrana nuclear y del RE (Siniossoglou *et al.*, 1998; Barbosa *et al.*, 2015), sería de gran interés estudiar si la separasa, en su relación con Pah1, tiene una función directa en la regulación de la dinámica nuclear en procesos tan importantes para la célula como es la mitosis. Una aproximación para estudiar los cambios en la membrana nuclear podría ser, estudiar las proteínas Pus1, marcador intranuclear, y Sec63, marcador de RE, ambas proteínas marcadas respectivamente con

TPANDANDANDANDAN

Uno de los principales problemas que nos encontramos al trabajar con los mutantes de Pah1 fue con el mutante de deleción *Apah1*. La regulación de Pah1 se traduce en un fino balance para mantener equilibrada la biosíntesis de lípidos en la formación de nueva membrana, acorde a las necesidades de la célula en cada momento. La ausencia de la fosfatasa Pah1 en el mutante $\Delta pah1$, pese a no ser esencial, provoca un crecimiento muy lento en las células aumentando la posibilidad de acumular supresores, lo que dificulta el trabajo con este mutante ya que al realizar la delección del gen mediante recombinación homóloga obteníamos al final supresores de Pah1. Por eso, la obtención del mutante *∆pah1* se obtuvo a partir de la deleción de uno de los alelos de *PAH1* en una cepa diploide, y posteriormente se aislaron e identificaron las esporas haploides con la deleción, obteniendo un haploide limpio del mutante $\Delta pah1$. Otra forma de estudiar la eliminación de Pah1 durante la mitosis es la utilización de un degrón de Pah1 para promover la degradación de la proteína en el momento deseado y no durante todo el ciclo celular. La multitud de respuestas aún por contestar con respecto a la relación de PAH1 y la separasa, los resultados preliminares que apuntan hacia una función de PAH1 en mitosis y la falta de publicaciones de la función de PAH1 en un contexto de abundancia de nutrientes, convierten a la fosfatasa PAH1 y el supresor esp1-2 pah1-C549T en grandes candidatos para seguir estudiando nuevas funciones reguladas por la separasa. Actualmente, otra compañera del grupo de investigación sigue adelante con este proyecto.

5.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE SAK1.

5.2.1. Sak1 ES UN REGULADOR POSITIVO DE LA SEPARASA.

La identificación de la mutación *sak1-G150A* como posible supresor del alelo termosensible de separasa, hizo plantearnos si Sak1 pudiera tener una función en la regulación de la mitosis dependiente del metabolismo celular. Sak1 es la principal quinasa activadora de Snf1, la principal vía de regulación para la adaptación de la célula a fuentes alternativas de carbono, además, de ser el sensor principal a diferentes tipos de estrés en la célula

DISCUSIÓN

(Nath et al., 2003; Hedbacker, Hong and Carlson, 2004; McCartney, Rubenstein and Schmidt, 2005; Elbing, McCartney and Schmidt, 2006). Algunos estudios previos en la bibliografía apuntan a una posible conexión entre la vía de Snf1 y diversas funciones de la regulación del ciclo celular: como la transcripción de *CLB5*, a través de la regulación de Swi6 sobre los complejos SBF y MBF (Pessina et al., 2010; Busnelli et al., 2013), la orientación de los cuerpos polares del huso (Tripodi et al., 2018) o la regulación de la transición G₁/S (Purnapatre et al., 2002). Además, existen otros precedentes de componentes importantes en las vías metabólicas de la célula que cumplen una doble función, componentes en el metabolismo de la célula y reguladores del ciclo celular, como el caso de TORC1 (Yamada et al., 2021) o PKA (Vandame et al., 2014; Dupré and Jessus, 2017). Sin embargo, en este caso, la interacción genética entre el mutante sak1-G150A y el mutante esp1-2 no se produce a través de la función conocida de Sak1 fosforilando la T210 de Snf1 (Fig. R9), ni a través de la vía de señalización de Snf1 (Fig. R8). Por tanto, de forma análoga a lo que ocurre respecto a la interacción de Sak1 con la nucleasa Pso2 en su función de respuesta al daño en el ADN (Munari et al., 2014), Sak1 estaría interaccionando con la separasa de forma independiente a su función como principal quinasa de Snf1. Esta hipótesis concuerda con otros resultados encontrados en su ortólogo, LKB1, dónde varios estudios muestran que LKB1 desempeña otras funciones adicionales e independientes a la activación de Snf1/AMPK, como en la regulación de la oxidación de lípidos durante el ejercicio (Jeppesen et al., 2013) o la regulación de la proliferación y la integridad genómica en la regeneración hepática (Maillet *et al.*, 2018).

Siendo que Sak1 participa en la regulación de Snf1 en ausencia de nutrientes o condiciones de estrés, un aspecto que uno se podía plantear es si las condiciones de los propios experimentos (presencia de galactosa para las expresiones ectópicas o crecimientos a temperaturas restrictivas) podrían estar interfiriendo en los resultados obtenidos, desencadenando un efecto indirecto. En el caso pSAK1, está descrito que la sobreexpresión de Sak1 en condiciones de glucosa abundante no producen cambios en el principal factor de transcripción regulado por Snf1, Mig1 (García-Salcedo *et al.*, 2014); ni tampoco produce ningún fenotipo la sobrexpresión de Sak1 frente al crecimiento en otras fuentes de carbono alternativas (etanol, glicerol y rafinosa), ni en otras condiciones de estrés como la salinidad (NaCl), presencia de cationes tóxicos para la célula (LiCl y CdCl) o pH alcalino (García-Salcedo et al., 2014). Esto es debido a que, pese a que Sak1 es la principal quinasa activadora de Snf1, esta activación se produce en unas determinadas condiciones para la célula, ya sea ausencia de glucosa o algún tipo de estrés, que no sólo activan a Sak1 si no que desencadena una regulación mayor sobre Snf1, implicando la regulación de las fosfatasas y la formación de diferentes complejos con las subunidades de Snf1. Por lo que la alteración de sólo una de las partes de esta regulación, en este caso Sak1, no desencadena un efecto final sobre Mig1 porque sigue estando presente

el resto de la regulación, como la desfosforilación de la fosfatasa Glc7/Reg1 sobre Mig1 y Snf1(Ghillebert *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Pese a descartar que Sak1 estuviera actuando sobre la separasa vía Snf1, para corroborar lo descrito en la literatura y descartar que las condiciones de fuente de carbono, temperatura o estrés estuvieran afectando de forma indirecta a nuestros resultados sobre la interacción de Sak1 y la separasa, se realizaron experimentos con las mismas condiciones pero creciendo los cultivos en medio rico en glucosa o en ausencia de glucosa en presencia de una fuente de carbono alternativa como la galactosa (condiciones en las que está descrito que se activa Snf1) y se obtuvieron idénticos resultados en ambos casos, corroborando que la actuación de Sak1 sobre Snf1 es independiente a su relación funcional con la separasa.

TOUNDON DON DON

Los resultados obtenidos nos muestran que existe una interacción genética entre SAK1 y ESP1 (Fig. R1 y R5), que la mutación supresora es activadora ya que presenta el mismo fenotipo que la sobreexpresión de separasa (Fig. R6 y R7), y la ausencia de efecto epistásico entre las dos mutaciones indican que la interacción genética entre SAK1 y *ESP1* se está dando en la misma vía de señalización que la separasa, lo que al principio nos hizo penar que Sak1 pudiera ser un nuevo sustrato de la separasa. Hasta el momento, en S. cerevisiae se conocen 3 sustratos sobre los que separasa actúa mediante su función proteolítica: Scc1 (Uhlmann et al., 1999), Rec8 (en meiosis) (Buonomo et al., 2000) y Slk19 (Sullivan et al., 2001), pero muchos autores piensan que podría haber más, debido a que la separasa promueve muchas otras funciones importantes dónde no se conoce del todo su implicación. Nuestros resultados con la sobreexpresión de la separasa no mostraron ningún indicio de corte sobre Sak1 (Fig. R23), por lo que la relación entre Sak1 y la separasa no se estaría produciendo mediante la acción proteolítica de la separasa sobre Sak1. Por tanto, nos planteamos la otra posibilidad: que la interacción fuera en sentido contrario y Sak1 estuviera actuando sobre la separasa. Sak1 es una quinasa a la cual sólo se le han descrito dos sustratos Snf1 (Nath *et al.*, 2003) y Pso2 (Munari *et al.*, 2014), por lo que no es descabellado pensar que tenga más sustratos y uno de ellos sea la separasa.

Los estudios de progresión en mitosis nos muestran que el mutante supresor y la expresión ectópica de *SAK1* recuperan las tres funciones principales promovidas por la separasa que se encuentran alteradas en el mutante sencillo *esp1-2* (Fig. R10, R12 y R13): la segregación cromosómica, la elongación del huso mitótica y la activación de Cdc14. Es remarcable como la actuación de Sak1 recupera todas las funciones promovidas por la separasa en mitosis, permitiendo que en el mutante supresor la separasa pueda volver a llevar a cabo todas sus funciones. Por lo que nos lleva a pensar que Sak1 estaría regulando la actividad de la separasa. Sin embargo, al no verse alterado el corte de

Scc1 en el mutante $\Delta sak1$ y el mutante sak1-G150A (Fig. R27) no estaría actuando directamente sobre la acción proteolítica de la separasa sobre la subunidad Scc1. Es especialmente llamativo que se recupere el corte de la subunidad Scc1 y la capacidad para segregar cromosomas correctamente que depende exclusivamente de la actividad proteolítica de la separasa. Estos resultados se entienden en el contexto en el que la proteína mutante del alelo *esp1-2* sigue estando presente y no se degrada a temperatura restrictiva (Fig. R24). Por consiguiente, los resultados nos sugieren que Sak1 podría estar regulando tanto la actividad proteolítica como no proteolítica de la separasa siendo Sak1 un regulador aguas arribas de la actividad de la separasa.

Actualmente, no podemos descartar la posibilidad de que Sak1 estuviera también regulando las principales funciones de la separasa de forma independiente. Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito ninguna otra proteasa capaz de escindir el complejo de cohesinas, por lo que dicha función parece exclusiva de la separasa. En el caso de la regulación del huso mitótico, Sak1 podría estar regulando la elongación del huso mitótico independientemente a las funciones promovidas por la separasa, ya que Sak1 interacciona físicamente con hasta dos componentes del cuerpo polar del huso: la proteína Spc42 y la proteína Spc110 (Breitkreutz *et al.*, 2010). Por otro lado, existen algunos precedentes en la literatura en los que se describe que el ortólogo de Sak1, LKB1, estaría involucrado en la orientación y localización del huso mitótico en células epiteliales, a través de la activación de AMPK (Spicer *et al.*, 2003; Mirouse *et al.*, 2007; Shelly and Poo, 2011; Wei et al., 2012). Aunque en S. cerevisiae, se ha descrito que sería Elm1 y no Sak1, a través de la vía de Snf1, quien tuviera el papel principal como quinasa regulando la orientación del huso mitótico (Moore et al., 2010; Tripodi et al., 2018). Sin embargo, en el caso de los mutantes *Asak1* y *sak1-G150A* no se aprecian cambios o defectos en la orientación del huso mitótico, ni tampoco en el huso mitótico del mutante supresor *esp1-2 sak1-G150A* (Figs. R11) que nos lleven a pensar una posible implicación de Sak1 en la regulación del huso mitótico.

En el caso de la activación de la fosfatasa Cdc14, nuestros resultados indican que Sak1 participa en la regulación de la liberación de Cdc14 del nucleolo durante la anafase, sugiriendo que sería un nuevo componente de la ruta FEAR. En ausencia de Sak1, observamos un retraso en la liberación de Cdc14 con respecto a la elongación del huso mitótico en los estudios de progresión en mitosis (Fig. R17 y R18). Este fenotipo es característico de los mutantes de la vía FEAR (Stegmeier *et al.* 2002; Sullivan *et al.*, 2004; Higuchi and Uhlmann, 2005; Sánchez-Diaz *et al.*, 2012). Por otro lado, las interacciones genéticas observadas entre $\Delta sak1$ y componentes de la vía FEAR (Stegmeier *et al.*, 2002; similares a los que se obtienen en mutantes de la vía FEAR (Stegmeier *et al.*, 2002; Sullivan *et al.*, 2004; Higuchi and Uhlmann 2005; Sánchez-Diaz *et al.*, 2012) corroboran que Sak1 participe en la vía FEAR. Por lo que todos los resultados aportados suponen una buena base para establecer a Sak1 como un nuevo componente de la vía FEAR.

TOUNDON DON DON

El hecho de que en ausencia de Sak1 se observe el típico retraso de liberación de Cdc14 en anafase temprana nos lleva a pensar que en este caso sí que pudiera tener una función directa en la activación de Cdc14 independiente de separasa. En la literatura, se muestra como la expresión ectópica de *ESP1* y *ZDS1* en células paradas en metafase es suficiente para la activación de la fosfatasa Cdc14 (Queralt and Uhlmann, 2008; Calabria et al., 2012; Játiva et al., 2019). Sin embargo, la expresión ectópica de Sak1 por sí sola en células paradas en metafase no es capaz de promover la liberación de Cdc14 del nucleolo (Fig. R15), sugiriendo que Sak1 regula la vía FEAR aguas arriba. Por otro lado, se ha descrito que la sobrexpresión de algunos componentes de la vía FEAR como SP012 o ZDS1, recupera la letalidad del mutante de la vía MEN cdc15-2 (Queralt and Uhlmann, 2008; Rossio et al., 2013; Caydasi et al., 2017). En nuestro caso, el mutante GAL1-SAK1 cdc15-2 a temperatura semirestrictiva no es capaz de recuperar el crecimiento del mutante cdc15-2 (Fig. R20), lo que no descarta que Sak1 sea un componente de la vía FEAR ya que hay otros componentes de la vía FEAR que no suprimen al mutante *cdc15-2*, pero sí sugiere que Sak1 no es capaz de regular la activación de Cdc14 de forma independiente a la separasa y restringe su acción aguas arriba de la separasa.

El inicio de los tres eventos claves en anafase: segregación de las cromátidas hermanas, elongación del huso mitótico y la liberación de Cdc14, se produce de forma simultánea con una sincronización digna de un reloj suizo (Holt, Krutchinsky and Morgan, 2008; Yaakov, Thorn and Morgan, 2012). A pesar de que el fenotipo del retraso en la liberación de Cdc14 en los mutantes de FEAR está ampliamente corroborado por la bibliografía existente, pueden existir otras circunstancias en las que se produzca la liberación de Cdc14 del nucleolo ajenas a la vía FEAR, como en el caso de la afectación de la inhibición de TORC1 en ausencia de glucosa, que da lugar a la liberación de Cdc14 del nucleolo, pero debido a la destrucción de Net1 (Yamada et al., 2021) o en condiciones de estrés térmico (Goranov et al., 2013) o estrés osmótico (Tognetti et al., 2020). Sin embargo, en los experimentos de microscopía confocal *in vivo* en el mutante $\Delta sak1$ la cuantificación de la señal de Cdc14 respecto a la señal de Net1 nos muestra que el retraso en la liberación de la fosfatasa Cdc14 se produce en anafase temprana mientras que la señal de Net1 se mantiene constante a lo largo del experimento, lo cual nos indica que Sak1 no regula los niveles proteicos de Net1 (Fig. R18). Pese a las diferentes evidencias aportadas que soportan la idea de que Sak1 es un componente de la vía FEAR y está actuando aguas arriba de la separasa en la liberación de Cdc14, no podemos descartar del todo que Sak1 pudiera estar actuando sobre Cdc14 de forma independiente a la separasa, en mitosis o en otra parte del ciclo, ya que está descrito que Sak1 interacciona físicamente con Cdc14 (Breitkreutz *et al.*, 2010). Sería interesante estudiar si en las tres funciones principales de la separasa en las que Sak1 podría estar involucrado se estaría llevando a cabo mediante un complejo Sak1-Esp1 donde Sak1 esté mediando las interacciones de separasa con las proteínas que va a regular. ¿Podría Sak1 interaccionar físicamente también con algún componente del complejo cohesina? Una investigación más a fondo y por separado con cada uno de los componentes relacionados sería necesaria para aportar más información a estas cuestiones.

5.2.3. Sak1 FOSFORILA A LA SEPARASA Y REGULA SU LOCALIZACIÓN SUBCELULAR.

Al repasar nuestros resultados vimos que apuntaban en una dirección ¿Podría Sak1 estar fosforilando a la separasa? Hemos visto que Sak1 fosforila a la separasa *in vitro* e *in vivo* (Fig. R33 y R33), aunque no sabemos si lo hace predominantemente en un algún momento del ciclo, sí que hemos observado un incremento en los niveles de fosforilación en el mutante *sak1-G150A*. Estos resultados son un punto y seguido en el estudio de la relación entre Sak1 y la separasa porque nos confirman que Sak1 está fosforilando a la separasa y que la recuperación de las funciones promovidas por la separasa en el mutante supresor *esp1-2 sak1-G150A* podría deberse a una mayor fosforilación (y activación) de la separasa; pero son un punto y seguido porque aún tenemos preguntas sin responder ¿Qué origina la fosforilación de Sak1 sobre la separasa?, ¿Cómo se regula Sak1?, ¿Cómo encaja que la separasa sea sustrato de Sak1 en la regulación global de la separasa?

Para abordar estas cuestiones, lo primero que hicimos fue estudiar los niveles de fosforilación de la separasa en un estudio de progresión en mitosis mediante *Western blot* usando geles de *Phos-tag*, pero no conseguimos obtener resultados concluyentes debido a la irreproducibilidad de los geles *Phos-tag*. Es importante tener en cuenta que el estudio de la fosforilación mediante el uso del compuesto de *Phos-tag* es especialmente difícil de aplicar en proteínas grandes como la separasa, difiere en cuanto cambias las más mínimas condiciones (incluso a veces sin cambiarlas) y varía enormemente su aplicación entre las diferentes proteínas. La detección de los cambios de fosforilación de la separasa en los mutantes analizados ha sido realmente difícil y solo conseguimos reproducirlos cuando se detecta la proteína tras una inmunoprecipitación de la separasa (Fig. 34). Algunos autores han intentado lidiar con este problema utilizando fragmentos

de la separasa en vez de la proteína en su totalidad, ya que conocían el residuo en el que está siendo fosforilada la separasa por su quinasa analizada (Lianga *et al.*, 2018). En nuestro caso, analizar una proteína truncada de la separasa tampoco nos ayudó a mejorar la detección de los cambios de fosforilación. En este caso delecionamos una región C-terminal (ya que es lo más fácil técnicamente) sin saber si dicha región es importante para la fosforilación de separasa, por lo que hemos podido eliminar residuos claves para su fosforilación. Además, esta aproximación creemos que tampoco es una estrategia del todo acertada. Analizar la fosforilación de una proteína con una regulación tan compleja, como es la separasa, dejando de lado la propia integridad estructural de la proteína, o si la quinasa a analizar pudiera estar fosforilando a la separasa, pero interactuando físicamente fuera del fragmento a analizar o a través de otra proteína adaptadora (por ejemplo, Cdc28-Clb2) crearía falsos negativos. También podría darse el caso contrario, una quinasa que pudiera fosforilar a la separasa en un momento del ciclo o en unas condiciones muy concretas, o que existiera una regulación inhibitoria alostérica dónde es necesaria la estructura completa (como la securina) estaría dando un falso positivo. Por tanto, descartamos la idea de estudiar la fosforilación de la separasa mediante *Phos-tag* utilizando diferentes fragmentos de esta proteína.

Aunque está ampliamente estudiada la fosforilación de Sak1 sobre Snf1 y se conoce que el residuo fosforilado es la T210 (Estruch *et al.*, 1992; McCartney and Schmidt 2001; Nath, McCartney and Schmidt, 2003; Elbing et al., 2006), no ocurre lo mismo con el otro sustrato conocido de Sak1, Pso2 (Munari et al., 2014), por lo que no se ha descrito una secuencia consenso de fosforilación para Sak1. Al no haberse establecido aun un sitio consenso para la actividad quinasa de Sak1, tampoco podemos predecir los posibles sitios de fosforilación en la secuencia de la separasa. Por este motivo, hemos recurrido al análisis por espectrometría de masas para buscar residuos fosforilados por Sak1, sin embargo, de momento no hemos sido capaces de detectar residuos fosforilados por espectrometría de masas. Debido al gran tamaño de la separasa y que es una proteína que se degrada con facilidad, de momento sólo se ha podido cubrir un 40% del total de la secuencia de la proteína, y no se han detectado ni las fosforilaciones descritas por Cdk1-Clb2 (Lianga et al., 2018) por lo que hay un margen de mejora considerable y esperamos tener mejores resultados en el futuro. Una vez obtenidos los posibles residuos fosforilados por la separasa, crearemos los correspondientes mutantes de los residuos candidatos para poder determinar cuál es el residuo (o residuos) fosforilado por Sak1. En los estudios publicados analizando el proteoma total de la levadura S. cerevisiae apenas se han podido identificar residuos fosforilados en la separasa por espectrometría de masas, ni sus correspondientes quinasas; en parte, suponemos porque ninguno de ellos ha conseguido una cobertura aceptable de la separasa. Los únicos residuos identificados en dichos estudios globales mediante espectrometría de



masas en la separasa son la S490 (sitio consenso mínimo para Cdc28-Clb2) (Holt *et al.*, 2009), la T1091 y la S1092 (Holt *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2011). En el trabajo publicado por Noel Lianga y sus colaboradores en 2019 establecen que Cdc28-Clb2 fosforilaría a la separasa en los residuos: T1014, S1027 y T1034, a partir de la predicción de los posibles residuos con el sitio consenso para Cdc28, aunque no hay confirmación por espectrometría de masas de que esos tres residuos estén siendo fosforilados por Cdc28-Clb2 (Lianga *et al.*, 2018). De hecho, tal y como ellos comentan en el propio trabajo, la mutación de esos tres sitios de fosforilación apenas da lugar a cambios sobre la actividad de la separasa en el mutante y sólo se apreciaría un efecto parcial en su interacción con la securina, por lo que no queda clara la relevancia funcional de dicha fosforilación. En nuestro caso, al no tener identificados los sitios de fosforilación de separasa por Sak1 nos limita para poder confirmar fehacientemente que los cambios de fosforilación de Sak1 regulan su localización subcelular.

Hasta el momento, hemos podido demostrar que Sak1 fosforila a la separasa y se requiere para la entrada al núcleo de la célula antes de la mitosis. En mitosis, observamos un descenso notable en la localización de la separasa en el núcleo en el mutante $\Delta sak1$ (Fig. R35), lo cual correlaciona con una menor fosforilación de separasa (Fig. R33); mientras que en el mutante *sak1-G150A*, que interacciona físicamente y fosforila a separasa en mayor grado (Fig. R32 y Fig. R33), se aprecia un aumento de los niveles de la separasa localizada en el núcleo (Fig. R35). En conclusión, Sak1 podría estar regulando las funciones promovidas por la separasa a través de la formación del complejo Esp1-Sak1, dónde Sak1 fosforilaría a Esp1 promoviendo su localización en el núcleo. Esto implicaría que Sak1 también se localice en el núcleo y es un punto que estamos estudiando en la actualidad. Los pocos datos conocidos sobre la localización de Sak1 nos indican que sería principalmente citoplasmática, pero esto no descarta que pudiera también ser nuclear o si su localización pudiera variar a lo largo del ciclo celular; sobre todo, teniendo en cuenta que LKB1 es tanto citoplasmática como nuclear (Shaw et al. 2004; Boudeau et al. 2004; Wei et al. 2012; Zubiete-Franco et al. 2019) y que está descrito que Sak1 interactúa con la nucleasa Pso2 a través del dominio C-terminal (Munari et al., 2014), que es una proteína nuclear, por lo que Sak1 podría localizarse en el núcleo.

Nuestros resultados muestran que Sak1 y la separasa interaccionan físicamente durante las fases más importantes para la separasa: metafase y anafase. Al interaccionar Sak1 y la separasa físicamente durante estas dos fases tan diferentes para la actividad de la separasa implicaría que Sak1 pudiera estar regulando a la separasa cuando está inhibida (metafase) y cuando está activa (anafase). A diferencia de la regulación ejercida por la securina, que se une a la separasa desde finales de G₁ y permanece unida a la separasa inhibiéndola hasta el inicio de anafase (Yamamoto et al., 1996; Cohen-Fix et al., 1996; Ciosk et al. 1998; Jensen et al., 2001; Hornig et al. 2002), Sak1 sí estaría unido a la separasa en el momento de llevar a cabo sus funciones (anafase) lo cual es consistente con que Sak1 es un regulador positivo de la separasa. Es plausible pensar que Sak1 podría, mediante un complejo con la separasa, facilitar el reconocimiento de los sustratos de separasa, ya que nuestros resultados muestran una interacción más fuerte entre Sak1 y separasa en anafase (Fig. R31) dónde la separasa se encuentra activa; así como una mayor interacción con el mutante supresor sak1-G150A en el cual también detectamos una mayor fosforilación de separasa (Fig. R32). Otra posible aproximación sería pensar que Sak1 podría tener una función localizando a la separasa en el núcleo, de forma similar a la función ejercida por la securina, acumulando a la separasa en el núcleo hasta el momento de llevar a cabo su función, por eso la interacción del complejo Esp1-Sak1 va aumentando hasta la anafase. De hecho, ambas funciones podrían ser compatibles y simultáneas, ya que la acumulación de la separasa en el núcleo por la securina es necesaria, pero no sería la única forma de entrar la separasa al núcleo porque aún se desconoce cómo se localiza la separasa en el núcleo en ausencia de la securina (Cohen-Fix et al., 1996; Agarwal and Cohen-Fix, 2002). Para poder establecer el momento de unión del complejo Esp1-Sak1 en el ciclo celular y conocer si Sak1 pudiera estar localizando a la separasa en el núcleo desde antes de la fase M, sería necesario comprobar mediante coinmunoprecipitación la interacción física Esp1-Sak1 y estudiar la localización de separasa en ausencia de Sak1 a lo largo de todas las fases del ciclo celular. Analizar la localización de separasa en el doble mutante $\Delta sak1 \Delta pds1$ o en el mutante Δpds1 sak1-G150A también nos ayudaría a entender mejor como Sak1 regula los cambios de localización de separasa.

Los resultados de la coinmunoprecipitación con el mutante supresor *sak1-G150A*, muestran una interacción física más intensa entre Sak1 y Esp1 en dicho mutante (Fig. R32), consistente con una mayor fosforilación de separasa en el mutante supresor (Fig. R33) y con el hecho de que la mutación *sak1-G150A* supondría una ganancia de función para Sak1. Sin embargo, en los experimentos de progresión de mitosis no se observa una aceleración de la mitosis en el mutante supresor *sak1-G150A* (Fig. R10). La posible razón de que está mayor interacción no otorgue ningún fenotipo característico en el mutante simple *sak1-G150A* reside en un sistema de regulación sumamente controlado como es el de la separasa en mitosis. Aunque Sak1 pueda regular las funciones promovidas por la separasa, existen otros reguladores inhibitorios sobre la separasa (como la securina) que no permiten que actúe antes de los establecido o de una forma más intensa de lo debido. Sólo cuando esta regulación se pueda ver alterada, como en el caso del mutantes *esp1-2*, se muestra un fenotipo debido a la ganancia de función de Cdc14 por si sola (con una sobreexpresión de Cdc14

(Visintin *et al.*, 1998) o mediante la inactivación de PP2A-Cdc55 (Baró *et al.*, 2013) no es suficiente para acelerar la progresión por mitosis. En el caso de que en el mutante $\Delta pds1$ *sak1-G150A* se observe una mayor localización nuclear de separasa, sería interesante estudiar la progresión de mitosis en este mutante donde podríamos ver una aceleración de la progresión de mitosis.

TPAN PAN PAN PAN PAN

Precisamente, un punto que ha quedado pendiente a lo largo de los diferentes apartados de esta discusión es cómo encaja la regulación de la securina junto a la nueva regulación de Sak1 sobre la separasa. La regulación sobre la securina ha sido ampliamente estudiada y las dos principales vías de regulación son: el balance de fosforilación/desfosforilación en diferentes residuos y el marcaje para su degradación por el complejo APC. Cada autor por su lado ha ido exponiendo la regulación descubierta en su investigación, pero en muchos casos, sin ponerla en un contexto global con el resto de las regulaciones conocidas sobre la securina, quedando esto patente por ejemplo, en las discrepancias entre los autores que defienden que sólo APC^{Cdc20} interviene en la degradación de la securina (Visintin, Prinz and Amon, 1997; Schwab, Lutun and Seufert, 1997) y los que postulan que tanto APC^{Cdc20} como APC^{Cdh1} marcan para su degradación a la securina (Rudner, Hardwick and Murray, 2000; Hilioti et al., 2001). El modelo que nosotros proponemos va en la línea con la regulación ya existente entre la securina y la separasa, pero rellena un hueco sin contestar que incluso algunos autores ya mencionan en sus trabajos. Ese hueco o pregunta sin contestar es ¿Cómo se localiza la separasa en el núcleo durante la mitosis en ausencia de la securina? Tanto Ritu Agarwal (Agarwal and Cohen-Fix, 2002), como Liam Holt (Holt, Krutchinsky and Morgan, 2008) y Nadine Horning (Hornig and Uhlmann, 2004) comentan en sus estudios que debería existir una regulación alternativa a la securina ya que el mutante $\Delta pds1$ no es letal y en ausencia de la securina la separasa sigue localizándose en el núcleo. Así mismo, en la publicación de 2001 de Sanne Jensen y colaboradores, dónde estudian la función de la securina promoviendo la localización de la separasa en los cuerpos polares del huso, describen que tanto en el mutante $\Delta pds1$, como en el mutante termosensible *pds1-128*^{ts}, la separasa sigue localizándose en el núcleo y en los cuerpos polares del huso, aunque con niveles menores que en un cepa salvaje (Jensen *et al.*, 2001). Teniendo presente que Sak1 interacciona físicamente con varios componentes del cuerpo polar del huso, podría indicar que Sak1 no sólo localiza a la separasa en el núcleo, sino que también secundariamente en el cuerpo polar del huso durante la anafase, momento en el que la interacción entre Sak1 y la separasa es más intensa. Nosotros proponemos que la regulación de Sak1 sobre la separasa actúa de forma paralela a la regulación ejercida por la securina, colaborando en la localización de la separasa en mitosis mediante el complejo Sak1-Esp1. En estos momentos no sabemos si la fosforilación de la separasa por Sak1 se produce antes o después de la entrada de la separasa al núcleo. Nuestra hipótesis es que primero Sak1 fosforilaría a la separasa y dicha fosforilación es la que promueve la entrada de la separasa al núcleo. Aunque formalmente cabe otra posibilidad, que Sak1 pueda fosforilar a la securina. Sin embargo, hay varios experimentos que descartan esta posibilidad, no vemos cambios en la fosforilación de securina en ninguno de los experimentos realizados (ni en el mutante *sak1-G150A*) y la interacción de Esp1-Sak1 se produce tanto en presencia (metafase) como en ausencia de securina (anafase).

TPAN IPAN IPAN IPAN IPAN

Antes de conocer que Sak1 se requiere para la correcta localización de separasa, una de las hipótesis que nos planteamos, pero descartamos tras algunos experimentos, fue que Sak1 pudiera regular los niveles proteicos de la separasa, ya sea en su transcripción o en su degradación. Realizamos ensayos con cicloheximida para inhibir la síntesis proteica y comparar el patrón de degradación de la separasa en una cepa salvaje, en el mutante *esp1-2* y el mutante supresor *esp1-2 sak1-G150A* a lo largo del tiempo. De forma preliminar, no vimos diferencias entre las tres cepas en la degradación de la separasa a lo largo de tres horas (datos no mostrados). Además, tampoco se observan cambios en los niveles proteicos de la separasa entre una cepa salvaje, el mutante *esp1-2* y el mutante supresor *esp1-2 sak1-G150A* desde metafase hasta finales de G₁ en los experimentos realizados para analizar la progresión en mitosis (Fig. R24). Por lo que descartamos la idea de que Sak1 regulara los niveles proteicos de separasa.

ESC 5.2.4. RELEVANCIA FUNCIONAL DE LA REGULACIÓN DE SEPARASA POR *SAK1*.

En modelos de ratón y en humanos, la sobreexpresión de la separasa da lugar a aneuploidías, tumorogénesis asociada directamente a diferentes tumores y a un peor pronóstico en otros cánceres (Zhang *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2009; Finetti *et al.*, 2014; Mukherjee *et al.*, 2014). Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de la separasa respecto a su interacción con Sak1, usamos un plásmido que consta de hasta 8 integraciones de la separasa y usado en estudios anteriores. La razón de elevar tanto los niveles de la separasa es porque sólo doblar o triplicar los niveles proteicos de la separasa no repercute en un fenotipo en la célula, debido a que la multitud de agentes reguladores que actúan sobre esta proteína frenan el efecto que podría tener ese aumento en los niveles de la separasa. Precisamente, por esta fuerte regulación a la que se encuentra sometida la separasa, hipotetizábamos que la ausencia de Sak1 o la mutación supresora podría suponer tan sólo un ligero fenotipo, adicional a la propia sobreexpresión de la separasa, en alguna de las funciones promovidas por la separasa.



DISCUSIÓN

separasa en el mutante GAL1-ESP1 sak1SAK1-G150A en células paradas en la transición metafase-anafase por la depleción de Cdc20 algo remarcable está sucediendo: no sólo se libera Cdc14, elonga el huso mitótico y se produce la segregación cromosómica (fenotipo de la expresión ectópica de la separasa en célula paradas en metafase) sino que, además, tiene lugar la correcta salida de las células a G₁ (Fig. R28 y R29). En este escenario, nos encontramos con que APC^{Cdc20} no se encuentra activo (no hay Cdc20) y por tanto la securina no es degradada, por lo que los excesivos niveles proteicos de la separasa con respecto a los niveles proteicos de la securina rebasan la inhibición negativa ejercida por la securina, siendo el exceso de la separasa libre y activa la que está llevando a cabo el corte de Scc1 (Sullivan and Uhlmann, 2003 y Fig. R30). Lo remarcable en esta cepa es que la expresión ectópica de la separasa en el mutante *sak1-G150A* es capaz de degradar Clb2 (Fig. R30), pese a que APC^{Cdc20} no está activo, por lo que Sak1 estaría promoviendo la degradación de las ciclinas mitóticas, paso necesario para salir de mitosis. Además, Sak1 estaría promoviendo otro de los pasos necesarios para la salida de mitosis, la acumulación del inhibidor de Cdc28, Sic1 (Fig. R30), iniciando la salida a G₁. En dicho experimento, incluso se llega a detectar la degradación posterior de Sic1 al entrar en fase S, indicando la continuación por el ciclo celular.

Un punto clave que abre un interrogante en la expresión ectópica de la separasa es la participación de la securina. La regulación de la securina sobre la separasa se produce 1:1 y esta regulación no solo es inhibitoria, sino que también es necesaria para la localización de la separasa y su posterior actuación sobre el complejo cohesina (Yamamoto et al., 1996; Cohen-Fix et al., 1996; Ciosk et al. 1998; Jensen et al., 2001; Hornig *et al.* 2002). Cuando sobreexpresamos la separasa a unos niveles tan elevados, no hay suficiente securina para regular la cantidad de separasa expresada, por lo que tenemos separasa libre, pero mediante la regulación por la securina no se podría explicar cómo esa gran cantidad de separasa libre llega al núcleo y además, está activa para realizar sus funciones. ¿Podría existir una regulación sobre la separasa adicional a la regulación ejercida por la securina que también transporte a la separasa al núcleo y la prepare para llevar a cabo sus funciones? Hay varias evidencias en la literatura que así lo sugieren. Por un lado, tenemos la regulación por parte de Cdk1-ciclinaB1 en vertebrados, que actuaría de forma redundante y excluyente a la securina (Stemmann et al., 2001). Aunque en levaduras esta regulación no podría llevarse a cabo de la misma forma, debido a las diferencias en la propia estructura de la separasa, ya que en el dominio IV de la estructura en S. cerevisiae no presente los mismos bucles inhibitorios, que como consecuencia de la unión de Cdk1-ciclinaB1, se pliegan hacía en el CD de la proteína (Gorr et al., 2005; Shindo, Kumada, and Hirota, 2012; Hellmuth et al., 2015); aunque no excluye la posibilidad de que pudiera existir una regulación por otra proteína que localizara y regulara a la separasa en el núcleo. Esta hipótesis concuerda con el hecho

de que la securina en *S. cerevisiae* no es esencial (Yamamoto *et al.*, 1996; Alexandru *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 2001) y en ausencia de la securina la separasa se localiza menos en el núcleo (Funabiki *et al.*, 1996; Stratmann and Lehner, 1996; Hornig *et al.*, 2002). En nuestros resultados con el mutante *GAL1-ESP1 sak1-G150*, la salida de las células a G_1 se produce sin que apenas haya la caída de Pds1 característica de la transición metafaseanafase en un ciclo celular normal. Por tanto, como se ha comentado anteriormente en esta discusión, aunque la mutación *sak1-G150* por ella sola no es capaz de acelerar la mitosis, cuando se combina con la expresión ectópica de separasa (*GAL1-ESP1 sak1-G150*), sí que observamos una aceleración de la progresión y salida de mitosis. Por lo que tener más separasa libre de la inhibición de la securina, activada por fosforilación por Sak1 y localizada en el núcleo, es suficiente para promover la salida de mitosis.

En la literatura, ciertos autores establecen dos puntos clave para que la célula lleve a cabo la progresión en mitosis: la activación de APC^{Cdc20} y la liberwación de la fosfatasa Cdc14. Si ponemos en conjunto la literatura actual y nuestros resultados, consideramos que sería más apropiado establecer que los dos puntos clave para que la célula progrese a través de mitosis serían: la activación de la separasa y la liberación de la fosfatasa Cdc14. En nuestros resultados, así como en otros estudios, como el caso de la salida de mitosis en el fenómeno del desbordamiento o sorpaso mitótico ("mitotic slippage") (Toda et al., 2012), o en la salida de mitosis por activación de TORC1 (Yamada et al., 2021), esta salida no se produce por la activación de APC^{Cdc20}, sino por la activación de APC^{Cdb1}. El fenómeno del sorpaso mitótico guarda cierta similitud con la salida a G, de células paradas en metafase en el mutante GAL1-ESP1 sak1-G150, ya que este fenómeno se suele dar cuando se degrada Clb2, se acumula Sic1, o ambos. Aunque en el caso del mutante GAL1-ESP1 sak1-G150 no se podría considerar estrictamente que se esté dando el sorpaso mitótico, puesto que para esto se requeriría que el SAC estuviera activo secuestrando a Cdc20 y en nuestros experimentos hemos deplecionando Cdc20 (Revisado en Rieder and Maiato, 2004). Dado que Sak1 hiperactivo podría estar promoviendo la salida de mitosis en células dónde se sobreexpresa la separasa, sería interesante investigar si Sak1 pudiera estar relacionado con la aparición de resistencias al tratamiento de tumores con fármacos antimicrotubulares que busquen producir apoptosis celular parando las células en metafase, como la Vinblastina o el Paclitaxel.

En el caso de Sak1, se sabe menos aún acerca de cómo se regula esta proteína aguas arriba. Con los datos que hay hasta el momento es casi como si observáramos una carretera de montaña a vista de pájaro: ves el inicio, ves diferentes finales, pero los tramos intermedios atraviesan túneles, por lo que desconocemos que ocurre en esas partes. Sabemos que Sak1 actúa regulando la utilización de fuentes alternativas de



carbono (Crabtree, 1929; Noor et al., 2003), actúa en respuesta diferentes tipos de estrés celular (Wilson, Hawley and Hardie, 1996; Jiang and Carlson, 1996; Gancedo, 1998; Carlson, 1999; McCartney and Schmidt, 2001) y actúa frente a daño en el DNA (Munari et al., 2014), pero poco se sabe acerca de cómo se lleva a cabo la activación de Sak1 en cada uno de estos casos. Por el momento, se conoce que Sak1 estaría siendo regulado negativamente mediante fosforilación en la S1074 por la quinasa PKA (cAMP-dependent protein kinase A) (Barrett et al., 2012); y en base a los estudios del proteoma total de la levadura S. cerevisiae mediante espectrometría de masas se han detectado varios residuos fosforilados en Sak1, dónde hasta 11 de los 17 residuos fosforilados detectados contienen sitios consenso para Cdc28 (Ubersax et al., 2003; Albuquerque et al., 2008; Holt et al., 2009; Breitkreutz et al., 2010; Zimmermann et al., 2017). Además, en el caso de Sak1 las modificaciones postraduccionales de la proteína pueden tener mayor relevancia porque, a diferencia de otras quinasas, Sak1 no cuenta con la activación de su centro activo mediante la fosforilación del residuo de treonina en el bucle de activación, conservado entre las diferentes quinasas (Nolen, Taylor and Ghosh, 2004; McCartney, Rubenstein and Schmidt, 2006). Es decir, que la quinasa Sak1 permanece constantemente activa y autofosforilándose y son las posibles modificaciones postraduccionales (fosforilación, ubiquitinación o sumoilación), así como la formación de complejos con otras proteínas, las que van a marcar su regulación. Esto queda patente en el ortólogo de Sak1 en células humanas, LKB1, dónde su regulación se lleva a cabo mediante la formación del complejo LKB1-STRAD-MO25, que determina su actividad, localización y afinidad por los sustratos (Boudeau et al., 2004), así como la regulación de su localización por sumoilación (Zubiete-Franco et al., 2019). Por tanto, nosotros planteamos dos posibles escenarios: Cdc28-Clb2 podría fosforilar a Sak1 y Sak1 fosforilar a la separasa, en vez de que Cdc28-Clb2 actuara directamente sobre la separasa; o que Cdc28-Clb2 junto a Sak1 formaran un complejo que se uniera a la separasa y tanto Cdc28 como Sak1 fosforilaran a la separasa (Fig. D1). Ambas posibilidades se nos acontecen plausibles al poner en conjunto nuestros resultados con los datos publicados en los que se describe que Cdc28-Clb2 fosforila a separasa (Lianga et al., 2018) y en vertebrados Cdk1-CiclinaB1 fosforila e inhibe a separasa (Gorr, Boos and Stemmann, 2005; Gorr et al., 2006). Además, Olaf Stemmann y sus colaboradores en 2001 en su trabajo con ovocitos de Xenopus, especulan sobre la posibilidad que una quinasa relacionada con la ruta de AMPK (LKB1 es la quinasas activadora de AMPK) actúe entre la actividad de Cdk1-CiclinaB1 y la fosforilación descrita en la separasa (Stemmann et al., 2001).

En conclusión, pensamos que la nueva regulación de la separasa mediada por la fosforilación de Sak1 supone un gran avance en el conocimiento de la regulación global de la separasa, aunque aún quedan preguntas por resolver. Nuestra aportación es un paso

relevante para entender nuevos mecanismos de regulación en la mitosis de *S. cerevisiae*, como lo fue en su momento el descubrimiento de la regulación alternativa y excluyente a la securina llevada a cabo por Cdk1-Ciclina B en células humanas. El estudio en células humanas sobre LKB1 para determinar si está regulación está conservada en organismos pluricelulares abriría una nueva ventana para investigaciones de gran relevancia en enfermedades con los diferentes cánceres en los que están implicados alguna de estas dos proteínas. El entendimiento de la posible conexión entre LKB1 (quinasa supresora de tumores) y la separasa (protooncogén) permitiría el desarrollo de nuevos fármacos con un gran impacto en estas enfermedades y posiblemente el descubrimiento de nuevos mecanismos de regulación de la mitosis. Esta tesis comenzó hablando acerca de que el ciclo celular es un conjunto ordenado de procesos biológicos mediante los cuales la célula crece y se divide en dos nuevas células, ahora, gracias a los resultados de esta tesis, podemos decir que conocemos un nuevo posible proceso biológico más de esta inmenso conjunto de procesos que llevan a cabo dentro del componente básico y más importante de todos los seres vivos, la célula.

A DAMPANDANDANDANDANDANDAN



Figura D1. Rrepresentacióon de las dos opciones del modelo propuesto. Izquierda) la interacción entre la separasa y Sak1 da lugar a la fosforilación de la separasa, el complejo Esp1-Sak1 entra al núcleo, actuando de forma alternativa a la regulación de la securina. **Derecha)** la interacción entre la separasa y Sak1 da lugar a la fosforilación de la separasa, esta fosforilación promueve la entrada de la separasa al núcleo, actuando de forma alternativa a la regulación de la separasa.

DISCUSIÓN

169



CONCLUSIONES



A partir de los resultados obtenidos durante esta investigación y para responder a los objetivos planteados al principio de esta tesis, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

A PANAPANAPANAPANAPANAPANAPANAPAN

1. *sak1-G150A* y *pah1-C549T* son mutaciones supresoras del alelo termosensible de la separasa *esp1-2.*

2. *SAK1* y *PAH1* interaccionan genéticamente con *ESP1*, sugiriendo que hay una relación funcional entre Sak1 y Pah1 con la separasa.

3. La mutación *sak1-G150A* presenta fenotipos similares a la expresión ectópica de *SAK1* y la proteína mutante *sak1-G150A* presenta mayor actividad quinasa *in vitro*, indicando que la mutación supresora es activadora de Sak1.

4. La mutación *sak1-G150A* recupera las tres funciones principales reguladas por la separasa durante la mitosis, sugiriendo que Sak1 promueve la reactivación de las funciones proteolíticas y no proteolíticas de la separasa.

5. La expresión ectópica de la separasa junto con su activación por Sak1 es suficiente para promover la salida de mitosis.

6. El mutante de deleción $\Delta sak1$ causa fenotipos similares a los mutantes de la vía FEAR en la liberación de Cdc14 del nucleolo y presenta interacciones sintético letales con mutantes de la vía MEN, por lo que se puede considerar que Sak1 es un nuevo componente de la vía FEAR que actúa aguas arriba de la separasa.

7. Sak1 fosforila a la separasa *in vitro* e *in vivo* y las dos proteínas copurifican durante la mitosis, sugiriendo que Sak1 participa en la regulación de la fosforilación de la separasa.

8. Sak1 regula la localización subcelular de la separasa durante la mitosis, sugiriendo que la fosforilación de separasa regula su localización subcelular.









Adams, I. R., & Kilmartin, J. V. (1999). Localization of core spindle pole body (SPB) components during SPB duplication in Saccharomyces cerevisiae. The Journal of cell biology, 145(4), 809–823. https://doi.org/10.1083/jcb.145.4.809

IPANIPANIPANIPANIPANIPANIPANIPAN

Agarwal, R., Tang, Z., Yu, H., & Cohen-Fix, O. (2003). Two distinct pathways for inhibiting pds1 ubiquitination in response to DNA damage. The Journal of biological chemistry, 278(45), 45027–45033. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M306783200</u>

Agarwal, R., & Cohen-Fix, O. (2002). Phosphorylation of the mitotic regulator Pds1/ securin by Cdc28 is required for efficient nuclear localization of Esp1/separase. Genes & development, 16(11), 1371–1382. <u>https://doi.org/10.1101/gad.971402</u>

Alepuz, P. M., Cunningham, K. W., & Estruch, F. (1997). Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated ENA1 gene. Molecular microbiology, 26(1), 91–98. <u>https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5531917.x</u>

Alexandru, G., Zachariae, W., Schleiffer, A., & Nasmyth, K. (1999). Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. The EMBO journal, 18(10), 2707–2721. <u>https://doi.org/10.1093/emboj/18.10.2707</u>

Alexandru, Gabriela & Uhlmann, Frank & Mechtler, Karl & Poupart, Marc-André & Nasmyth, Kim. (2001). Phosphorylation of the Cohesin Subunit Scc1 by Polo/Cdc5 Kinase Regulates Sister Chromatid Separation in Yeast. Cell. 105. 459-72. <u>https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00362-2</u>

Amon, A., Tyers, M., Futcher, B., & Nasmyth, K. (1993). Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. Cell, 74(6), 993–1007. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90722-3

Anderson, D. E., Losada, A., Erickson, H. P., & Hirano, T. (2002). Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. The Journal of cell biology, 156(3), 419–424. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.200111002</u>

Avizienyte, E., Loukola, A., Roth, S., Hemminki, A., Tarkkanen, M., Salovaara, R., Arola, J., Bützow, R., Husgafvel-Pursiainen, K., Kokkola, A., Järvinen, H., & Aaltonen, L. A. (1999). LKB1 somatic mutations in sporadic tumors. The American journal of pathology, 154(3), 677–681. <u>https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65314-X</u>

Azzam, R., Chen, S. L., Shou, W., Mah, A. S., Alexandru, G., Nasmyth, K., Annan, R. S., Carr, S. A., & Deshaies, R. J. (2004). Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus. Science (New York, N.Y.), 305(5683), 516–519. <u>https://doi.org/10.1126/science.1099402</u>

Azzam, R., Chen, L.S., Shou, W., Mah, S.A., Alexandru, G., Nasmyth, K., Annan, S.R., Carr, A.S., & Deshaies, J.R. (2004). Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus. Science, 305,516-519. <u>https://DOI:10.1126/science.1099402</u>

Baas, A. F., Kuipers, J., van der Wel, N. N., Batlle, E., Koerten, H. K., Peters, P. J., & Clevers, H. C. (2004). Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. Cell, 116(3), 457–466. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00114-x</u>

Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebl, M., Harper, J. W., & Elledge, S. J. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. Cell, 86(2), 263–274. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80098-7</u>

Barbet, N. C., Schneider, U., Helliwell, S. B., Stansfield, I., Tuite, M. F., & Hall, M. N. (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. Molecular biology of the cell, 7(1), 25–42. https://doi.org/10.1091/mbc.7.1.25

Bardin, A. J., Visintin, R., & Amon, A. (2000). A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus. Cell, 102(1), 21–31. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00007-6</u>

Bardin, A. J., & Amon, A. (2001). Men and sin: what's the difference?. Nature reviews. Molecular cell biology, 2(11), 815–826. <u>https://doi.org/10.1038/35099020</u>

Baro, B., Rodriguez-Rodriguez, J. A., Calabria, I., Hernáez, M. L., Gil, C., & Queralt, E. (2013). Dual Regulation of the mitotic exit network (MEN) by PP2A-Cdc55 phospha-



tase. PLoS genetics, 9(12), e1003966. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003966

Baroni, M.D., Monti, P. & Alberghina, L. (1994). Repression of growth-regulated G1 cyclin expression by cyclic AMP in budding yeast. Nature 371, 339–342

Barral, Y., Jentsch, S., & Mann, C. (1995). G1 cyclin turnover and nutrient uptake are controlled by a common pathway in yeast. Genes & development, 9(4), 399–409. https://doi.org/10.1101/gad.9.4.399

Barrett, A. J., & Rawlings, N. D. (2001). Evolutionary lines of cysteine peptidases. Biological chemistry, 382(5), 727–733. <u>https://doi.org/10.1515/BC.2001.088</u>

Barrett, L., Orlova, M., Maziarz, M., & Kuchin, S. (2012). Protein Kinase A Contributes to the Negative Control of Snf1 Protein Kinase in Saccharomyces cerevisiae. Eukaryotic Cell, 11(2), 119-128. <u>https://doi.org/10.1128/EC.05061-11</u>

Baskerville, C., Segal, M., & Reed, S. I. (2008). The Protease Activity of Yeast Separase (Esp1) Is Required for Anaphase Spindle Elongation Independently of Its Role In Cleavage of Cohesin. Genetics, 178(4), 2361-2372. <u>https://doi.org/10.1534/genet-ics.107.085308</u>

Bauerschmidt, C., Arrichiello, C., Burdak-Rothkamm, S., Woodcock, M., Hill, M.A. & Stevens, D.L. Rothkamm K. (2010). Cohesin promotes the repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks in replicated chromatin. Nucleic Acids Research. 38(2):477-87. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gkp976</u>

Baum, P., Yip, C., Goetsch, L., & Byers, B. (1988). A yeast gene essential for regulation of spindle pole duplication. Molecular and cellular biology, 8(12), 5386–5397. https://doi.org/10.1128/mcb.8.12.5386-5397.1988

Bäumer, M., Braus, G. H., & Irniger, S. (2000). Two different modes of cyclin clb2 proteolysis during mitosis in Saccharomyces cerevisiae. FEBS letters, 468(2-3), 142–148. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01208-4

Belle, A., Tanay, A., Bitincka, L., Shamir, R., & O'Shea, E. K. (2006). Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. Proceedings of the National Acade-




my of Sciences of the United States of America, 103(35), 13004–13009. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.0605420103</u>

Bembenek, J., Kang, J., Kurischko C., Li, B., Raab, R.J., Belanger, D.K., Luca, C.F. & Yu, H. (2005) Crm1-mediated nuclear export of Cdc14 is required for the completion of cy-tokinesis in budding yeast. Cell Cycle, 4(7), 961-971, DOI: 10.4161/cc.4.7.179

Bendrioua, L., Smedh, M., Almquist, J., Cvijovic, M., Jirstrand, M., Goksör, M., Adiels, C. B., & Hohmann, S. (2014). Yeast AMP-activated protein kinase monitors glucose concentration changes and absolute glucose levels. The Journal of biological chemistry, 289(18), 12863–12875. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M114.547976</u>

Bernal, J. A., Luna, R., Espina, A., Lázaro, I., Ramos-Morales, F., Romero, F., Arias, C., Silva, A., Tortolero, M., & Pintor-Toro, J. A. (2002). Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. Nature genetics, 32(2), 306–311. <u>https://doi.org/10.1038/ng997</u>

Bernstein, K. A., Bleichert, F., Bean, J. M., Cross, F. R., & Baserga, S. J. (2007). Ribosome biogenesis is sensed at the Start cell cycle checkpoint. Molecular biology of the cell, 18(3), 953–964. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.e06-06-0512</u>

Berset, C., Griac, P., Tempel, R., La Rue, J., Wittenberg, C., & Lanker, S. (2002). Transferable domain in the G(1) cyclin Cln2 sufficient to switch degradation of Sic1 from the E3 ubiquitin ligase SCF(Cdc4) to SCF(Grr1). Molecular and cellular biology, 22(13), 4463–4476. <u>https://doi.org/10.1128/MCB.22.13.4463-4476.2002</u>

Bhaduri, Anik & Ringler, Claudia & Dombrowski, Ines & Mohtar, Rabi & Scheumann, Waltina. (2015). Sustainability in the water–energy–food nexus. Water International. 40. 723-732. https://doi.org/10.1080/02508060.2015.1096110

Bloom, M. S., Koshland, D., & Guacci, V. (2018). Cohesin Function in Cohesion, Condensation, and DNA Repair Is Regulated by Wpl1p via a Common Mechanism in Saccharomyces cerevisiae. Genetics, 208(1), 111–124. <u>https://doi.org/10.1534/genetics.117.300537</u>

Boehlke, C., Kotsis, F., Patel, V., Braeg, S., Voelker, H., Bredt, S., Beyer, T., Janusch, H.,



Hamann, C., Gödel, M., Müller, K., Herbst, M., Hornung, M., Doerken, M., Köttgen, M., Nitschke, R., Igarashi, P., Walz, G., & Kuehn, E. W. (2010). Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. Nature cell biology, 12(11), 1115–1122. <u>https://doi.org/10.1038/ncb2117</u>

TPAN TPAN TPAN TPAN TPAN TPAN TPAN

Booher, R. N., Deshaies, R. J., & Kirschner, M. W. (1993). Properties of Saccharomyces cerevisiae weel and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. The EMBO journal, 12(9), 3417–3426. <u>https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06016.x</u>

Botchkarev, V. V., Jr, Garabedian, M. V., Lemos, B., Paulissen, E., & Haber, J. E. (2017). The budding yeast Polo-like kinase localizes to distinct populations at centrosomes during mitosis. Molecular biology of the cell, 28(8), 1011–1020. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.E16-05-0324</u>

Botman, D., de Groot, D. H., Schmidt, P., Goedhart, J., & Teusink, B. (2019). In vivo characterisation of fluorescent proteins in budding yeast. Scientific Reports, 9(1), 2234. https://doi.org/10.1038/s41598-019-38913-z

Boudaoud, I., Fournier, É., Baguette, A., Vallée, M., Lamaze, F. C., Droit, A., & Bilodeau, S. (2017). Connected gene communities underlie transcriptional changes in cornelia de lange syndrome. Genetics, 207(1), Article 1. <u>https://doi.org/10.1534/genetics.117.202291</u>

Boudeau, J., Scott, J. W., Resta, N., Deak, M., Kieloch, A., Komander, D., Hardie, D. G., Prescott, A. R., van Aalten, D. M. F., & Alessi, D. R. (2004). Analysis of the LKB1-STRAD-M025 complex. Journal of Cell Science, 117(Pt 26), 6365-6375. <u>https://doi.org/10.1242/jcs.01571</u>

Bremmer, S. C., Hall, H., Martinez, J. S., Eissler, C. L., Hinrichsen, T. H., Rossie, S., Parker, L. L., Hall, M. C., & Charbonneau, H. (2012). Cdc14 phosphatases preferentially dephosphorylate a subset of cyclin-dependent kinase (Cdk) sites containing phosphoserine. The Journal of biological chemistry, 287(3), 1662–1669. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.</u> <u>M111.281105</u>

Bristow, S. L., Leman, A. R., Simmons Kovacs, L. A., Deckard, A., Harer, J., & Haase, S. B. (2014). Checkpoints couple transcription network oscillator dynamics to cell-cycle progression. Genome biology, 15(9), 446. <u>https://doi.org/10.1186/s13059-014-0446-7</u>

Buonomo, S. B., Rabitsch, K. P., Fuchs, J., Gruber, S., Sullivan, M., Uhlmann, F., Petronczki, M., Tóth, A., & Nasmyth, K. (2003). Division of the nucleolus and its release of CDC14 during anaphase of meiosis I depends on separase, SPO12, and SLK19. Developmental cell, 4(5), 727–739. <u>https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00129-1</u>

Buonomo, Sara & Clyne, Rosemary & Fuchs, Joerg & Loidl, Josef & Uhlmann, Frank & Nasmyth, Kim. (2000). Buonomo, SB, Clyne, RK, Fuches, J, Loidl, J, Uhlmann, F, Nasmyth, K. Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. Cell, 103: 387-398. Cell. 103. 387-98. <u>https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00131-8</u>

Burkewitz, K., Zhang, Y., & Mair, W. B. (2014). AMPK at the Nexus of Energetics and Aging. Cell Metabolism, 20(1), 10-25. <u>https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.002</u>

Byers, B., & Goetsch, L. (1975). Behavior of spindles and spindle plaques in the cell cycle and conjugation of Saccharomyces cerevisiae. Journal of bacteriology, 124(1), 511–523. <u>https://doi.org/10.1128/jb.124.1.511-523.1975</u>

Cacace, A. M., Hickey, C. M., & Békés, M. (Eds.). (2021). Targeted Protein Degradation: Methods and Protocols (Vol. 2365). Springer US. <u>https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1665-9</u>

Calabria, I., Baro, B., Rodriguez-Rodriguez, J. A., Russiñol, N., & Queralt, E. (2012). Zds1 regulates PP2A(Cdc55) activity and Cdc14 activation during mitotic exit through its Zds_C motif. Journal of cell science, 125(Pt 12), 2875–2884. <u>https://doi.org/10.1242/jcs.097865</u>

Campbell, I. W., Zhou, X., & Amon, A. (2019). The Mitotic Exit Network integrates temporal and spatial signals by distributing regulation across multiple components. eLife, 8, e41139. <u>https://doi.org/10.7554/eLife.41139</u>

ADDA DA MDA MDA MDA MDA MDA MDA MDA

Carlson M. (1999). Glucose repression in yeast. Current opinion in microbiology, 2(2), 202–207. <u>https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80035-6</u>

Caydasi, A. K., & Pereira, G. (2009). Spindle alignment regulates the dynamic association of checkpoint proteins with yeast spindle pole bodies. Developmental cell, 16(1), 146–156. <u>https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.10.013</u>

Chant, J., & Pringle, J. R. (1995). Patterns of bud-site selection in the yeast Saccharomyces cerevisiae. The Journal of cell biology, 129(3), 751–765. <u>https://doi.org/10.1083/</u> jcb.129.3.751

Chao, W. C., Kulkarni, K., Zhang, Z., Kong, E. H., & Barford, D. (2012). Structure of the mitotic checkpoint complex. Nature, 484(7393), 208–213. <u>https://doi.org/10.1038/nature10896</u>

Charles, J. F., Jaspersen, S. L., Tinker-Kulberg, R. L., Hwang, L., Szidon, A., & Morgan, D. O. (1998). The polo-related kinase cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in S. cerevisiae. Current Biology, 8(9), Article 9. <u>https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70201-5</u>

Charvin G, Oikonomou C, Siggia ED, Cross FR (2010) Origin of Irreversibility of Cell Cycle Start in Budding Yeast. PLOS Biology 8(1): e1000284. <u>https://doi.org/10.1371/</u> journal.pbio.1000284

Chen, K. C., Csikasz-Nagy, A., Gyorffy, B., Val, J., Novak, B., & Tyson, J. J. (2000). Kinetic analysis of a molecular model of the budding yeast cell cycle. Molecular biology of the cell, 11(1), 369–391. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.11.1.369</u>

Chen, X., Hastings, P. D., Rubin, K. H., Chen, H., Cen, G., & Stewart, S. L. (1998). Child-rearing attitudes and behavioral inhibition in Chinese and Canadian toddlers: a cross-cultural

study. Developmental psychology, 34(4), 677–686. <u>https://doi.org/10.1037//0012-</u> <u>1649.34.4.677</u>

INPANPANPANPANPANPANPANP

Chetaille, P., Preuss, C., Burkhard, S., Côté, J. M., Houde, C., Castilloux, J., Piché, J., Gosset, N., Leclerc, S., Wünnemann, F., Thibeault, M., Gagnon, C., Galli, A., Tuck, E., Hickson, G. R., El Amine, N., Boufaied, I., Lemyre, E., de Santa Barbara, P., Faure, S., ... Andelfinger, G. (2014). Mutations in SGOL1 cause a novel cohesinopathy affecting heart and gut rhythm. Nature genetics, 46(11), 1245–1249. <u>https://doi.org/10.1038/ng.3113</u>

Ciosk, R., Shirayama, M., Shevchenko, A., Tanaka, T., Toth, A., Shevchenko, A., & Nasmyth, K. (2000). Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. Molecular cell, 5(2), 243–254. <u>https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80420-7</u>

Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., & Nasmyth, K. (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. Cell, 93(6), 1067–1076. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81211-8</u>

Clemente-Blanco, A., Mayán-Santos, M., Schneider, D. A., Machín, F., Jarmuz, A., Tschochner, H., & Aragón, L. (2009). Cdc14 inhibits transcription by RNA polymerase I during anaphase. Nature, 458(7235), 219–222. <u>https://doi.org/10.1038/nature07652</u>

Clemente-Blanco, A., Sen, N., Mayan-Santos, M., Sacristán, M. P., Graham, B., Jarmuz, A., Giess, A., Webb, E., Game, L., Eick, D., Bueno, A., Merkenschlager, M., & Aragón, L. (2011). Cdc14 phosphatase promotes segregation of telomeres through repression of RNA polymerase II transcription. Nature cell biology, 13(12), 1450–1456. <u>https://doi.org/10.1038/ncb2365</u>

Clift, D., Bizzari, F., & Marston, A. L. (2009). Shugoshin prevents cohesin cleavage by PP2A(Cdc55)-dependent inhibition of separase. Genes & development, 23(6), 766–780. <u>https://doi.org/10.1101/gad.507509</u>

Cohen-Fix, O., Peters, J. M., Kirschner, M. W., & Koshland, D. (1996). Anaphase initiation in Saccharomyces cerevisiae is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. Genes & development, 10(24), 3081–3093. <u>https://doi.</u>





org/10.1101/gad.10.24.3081

Colomina, N., Guasch, C., & Torres-Rosell, J. (2017). Analysis of SUMOylation in the RENT Complex by Fusion to a SUMO-Specific Protease Domain. En F. Monje-Casas & E. Queralt (Eds.), The Mitotic Exit Network: Methods and Protocols (pp. 97-117). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6502-1_9

Corradetti, M. N., Inoki, K., Bardeesy, N., DePinho, R. A., & Guan, K. L. (2004). Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. Genes & development, 18(13), 1533–1538. https://doi.org/10.1101/gad.1199104

Costanzo, M., Kuzmin, E., Van Leeuwen, J., Mair, B., Moffat, J., Boone, C., & Andrews, B. (2019). Global Genetic Networks and the Genotype-to-Phenotype Relationship. Cell, 177(1), 85-100. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.033</u>

Costanzo, M., Nishikawa, J. L., Tang, X., Millman, J. S., Schub, O., Breitkreuz, K., Dewar, D., Rupes, I., Andrews, B., & Tyers, M. (2004). CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. Cell, 117(7), 899–913. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> cell.2004.05.024

Crabtree H. G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. The Biochemical journal, 23(3), 536–545. <u>https://doi.org/10.1042/bj0230536</u>

Cross F. R. (1988). DAF1, a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of Saccharomyces cerevisiae. Molecular and cellular biology, 8(11), 4675–4684. <u>https://doi.org/10.1128/mcb.8.11.4675-4684.1988</u>

Csizmok, V., Orlicky, S., Cheng, J., Song, J., Bah, A., Delgoshaie, N., Lin, H., Mittag, T., Sicheri, F., Chan, H. S., Tyers, M., & Forman-Kay, J. D. (2017). An allosteric conduit facilitates dynamic multisite substrate recognition by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. Nature communications, 8, 13943. <u>https://doi.org/10.1038/ncomms13943</u>

Csizmok, V., Felli, I. C., Tompa, P., Banci, L., & Bertini, I. (2008). Structural and Dynamic Characterization of Intrinsically Disordered Human Securin by NMR Spectroscopy. Journal of the American Chemical Society, 130(50), 16873-16879. <u>https://doi.</u> org/10.1021/ja805510b

D'Amours, D., Stegmeier, F., & Amon, A. (2004). Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA. Cell, 117(4), 455–469. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00413-1</u>

D'Aquino, K. E., Monje-Casas, F., Paulson, J., Reiser, V., Charles, G. M., Lai, L., Shokat, K. M., & Amon, A. (2005). The protein kinase Kin4 inhibits exit from mitosis in response to spindle position defects. Molecular cell, 19(2), 223–234. <u>https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.005</u>

Darwiche, N., Freeman, L. A., & Strunnikov, A. (1999). Characterization of the components of the putative mammalian sister chromatid cohesion complex. Gene, 233(1-2), 39–47. <u>https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00160-2</u>

de Bruin, R. A., McDonald, W. H., Kalashnikova, T. I., Yates, J., 3rd, & Wittenberg, C. (2004). Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. Cell, 117(7), 887–898. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.025</u>

De Bruin, R. A. M., McDonald, W. H., Kalashnikova, T. I., Yates, J., & Wittenberg, C. (2004). Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. Cell. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.025</u>

Deardorff, J., Hayward, C., Wilson, K. A., Bryson, S., Hammer, L. D., & Agras, S. (2007). Puberty and gender interact to predict social anxiety symptoms in early adolescence. The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine, 41(1), 102–104. <u>https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2007.02.013</u>

DeCesare, J. M., & Stuart, D. T. (2012). Among B-type cyclins only CLB5 and CLB6 promote premeiotic S phase in Saccharomyces cerevisiae. Genetics, 190(3), 1001–1016. https://doi.org/10.1534/genetics.111.134684

Deng, Z., Wang, Z., Stong, N., Plasschaert, R., Moczan, A., Chen, H. S., Hu, S., Wikramasinghe, P., Davuluri, R. V., Bartolomei, M. S., Riethman, H., & Lieberman, P. M. (2012).

BIBLIOGRAFÍA

A role for CTCF and cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection. The EMBO journal, 31(21), 4165–4178. <u>https://doi.org/10.1038/emboj.2012.266</u>

IPANIPANIPANIPANIPANIPANIPANIPAN

Deshaies, R. J., & Joazeiro, C. A. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. Annual review of biochemistry, 78, 399–434. <u>https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.101807.093809</u>

Di Fiore, B., Davey, N. E., Hagting, A., Izawa, D., Mansfeld, J., Gibson, T. J., & Pines, J. (2015). The ABBA motif binds APC/C activators and is shared by APC/C substrates and regulators. Developmental cell, 32(3), 358–372. <u>https://doi.org/10.1016/j.dev-cel.2015.01.003</u>

Dirick, L., Böhm, T., & Nasmyth, K. (1995). Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of Saccharomyces cerevisiae. The EMBO journal, 14(19), 4803–4813. <u>https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00162.x</u>

Dogliotti, G., Kullmann, L., Dhumale, P., Thiele, C., Panichkina, O., Mendl, G., Houben, R., Haferkamp, S., Püschel, A. W., & Krahn, M. P. (2017). Membrane-binding and activation of LKB1 by phosphatidic acid is essential for development and tumour suppression. Nature communications, 8, 15747. <u>https://doi.org/10.1038/ncomms15747</u>

Dong, X.M., Revol, J.F. and Gray, D.G. (1998) Effect of Microcrystallite Preparation Conditions on the Formation of Colloid Crystals of Cellulose. Cellulose, 5, 19-32

Dubacq, C., Chevalier, A., & Mann, C. (2004). The protein kinase Snf1 is required for tolerance to the ribonucleotide reductase inhibitor hydroxyurea. Molecular and cellular biology, 24(6), 2560–2572. https://doi.org/10.1128/MCB.24.6.2560-2572.2004

Dunker, A.K. & Obradovic, Z & Romero, Pedro & Garner, Ethan & Brown, Celeste. (2000). Intrinsic Protein Disorder in Complete Genomes. Genome informatics. Workshop on Genome Informatics. 11. 161-71.

Edgington, N. P., & Futcher, B. (2001). Relationship between the function and the location of G1 cyclins in S. cerevisiae. Journal of cell science, 114(Pt 24), 4599–4611. https://doi.org/10.1242/jcs.114.24.4599

187

Elbing, K., McCartney, R. R., & Schmidt, M. C. (2006). Purification and characterization of the three Snf1-activating kinases of Saccharomyces cerevisiae. The Biochemical journal, 393(Pt 3), 797–805. <u>https://doi.org/10.1042/BJ20051213</u>

Elbing, K., Rubenstein, E. M., McCartney, R. R., & Schmidt, M. C. (2006). Subunits of the Snf1 kinase heterotrimer show interdependence for association and activity. The Journal of biological chemistry, 281(36), 26170–26180. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.</u> <u>M603811200</u>

Enervald, E., Du, L., Visnes, T., Björkman, A., Lindgren, E., Wincent, J., Borck, G., Colleaux, L., Cormier-Daire, V., van Gent, D. C., Pie, J., Puisac, B., de Miranda, N. F., Kracker, S., Hammarström, L., de Villartay, J. P., Durandy, A., Schoumans, J., Ström, L., & Pan-Hammarström, Q. (2013). A regulatory role for the cohesin loader NIPBL in nonhomologous end joining during immunoglobulin class switch recombination. The Journal of experimental medicine, 210(12), 2503–2513. <u>https://doi.org/10.1084/jem.20130168</u>

Epstein, C. B., & Cross, F. R. (1992). CLB5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. Genes & development, 6(9), 1695–1706. <u>https://doi.org/10.1101/gad.6.9.1695</u>

Esteras, M., Liu, I.-C., Snijders, A. P., Jarmuz, A., & Aragon, L. (s. f.) (2017). Identification of SUMO conjugation sites in the budding yeast proteome. Microbial Cell, 4(10), 331-341. <u>https://doi.org/10.15698/mic2017.10.593</u>

Estruch, F., Treitel, M. A., Yang, X., & Carlson, M. (1992). N-terminal mutations modulate yeast SNF1 protein kinase function. Genetics, 132(3), 639–650. <u>https://doi.org/10.1093/genetics/132.3.639</u>

Fantes P. A. (1977). Control of cell size and cycle time in Schizosaccharomyces pombe. Journal of cell science, 24, 51–67. <u>https://doi.org/10.1242/jcs.24.1.51</u>

Feldman, R. M., Correll, C. C., Kaplan, K. B., & Deshaies, R. J. (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. Cell, 91(2), 221–230. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80404-3</u>

Ferguson, B. M., Brewer, B. J., Reynolds, A. E., & Fangman, W. L. (1991). A yeast or-





I PANIPANIPANIPANIPANIPANIPANIPAN

Fernandez, P., Carretero, J., Medina, P. P., Jimenez, A. I., Rodriguez-Perales, S., Paz, M. F., Cigudosa, J. C., Esteller, M., Lombardia, L., Morente, M., Sanchez-Verde, L., Sotelo, T., & Sanchez-Cespedes, M. (2004). Distinctive gene expression of human lung adenocarcinomas carrying LKB1 mutations. Oncogene, 23(29), 5084–5091. <u>https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207665</u>

Fernández-Murray, J. P., & McMaster, C. R. (2016). Lipid synthesis and membrane contact sites: A crossroads for cellular physiology. Journal of Lipid Research, 57(10), 1789-1805. <u>https://doi.org/10.1194/jlr.R070920</u>

Ferrezuelo, F., Colomina, N., Futcher, B., & Aldea, M. (2010). The transcriptional network activated by Cln3 cyclin at the G1-to-S transition of the yeast cell cycle. Genome biology, 11(6), R67. <u>https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-6-r67</u>

Finley, D., Ulrich, H. D., Sommer, T., & Kaiser, P. (2012). The ubiquitin-proteasome system of Saccharomyces cerevisiae. Genetics, 192(2), 319–360. <u>https://doi.org/10.1534/genetics.112.140467</u>

Fischer, M., Dang, C. V., & DeCaprio, J. A. (2018). Chapter 17—Control of Cell Division. En R. Hoffman, E. J. Benz, L. E. Silberstein, H. E. Heslop, J. I. Weitz, J. Anastasi, M. E. Salama, & S. A. Abutalib (Eds.), Hematology (Seventh Edition) (pp. 176-185). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35762-3.00017-2

Fitch, I., Dahmann, C., Surana, U., Amon, A., Nasmyth, K., Goetsch, L., Byers, B., & Futcher, B. (1992). Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast Saccharomyces cerevisiae. Molecular biology of the cell, 3(7), 805–818. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.3.7.805</u>

Freeman, M. V., Williams, D. W., Schimke, R. N., Temtamy, S. A., Vachier, E., & German, J. (1974). The Roberts syndrome. Clinical genetics, 5(1), 1–16. <u>https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1974.tb01652.x</u>

Freese, E. B., Chu, M. I., & Freese, E. (1982). Initiation of yeast sporulation of partial



carbon, nitrogen, or phosphate deprivation. Journal of bacteriology, 149(3), 840–851. https://doi.org/10.1128/jb.149.3.840-851.1982

ADAM DAM DAM DAM DAM DAM

Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T., & Yanagida, M. (1996). Cut2 proteolysis required for sister-chromatid seperation in fission yeast. Nature, 381(6581), 438–441. <u>https://doi.org/10.1038/381438a0</u>

Funabiki, H., Yamano, H., Nagao, K., Tanaka, H., Yasuda, H., Hunt, T., & Yanagida, M. (1997). Fission yeast Cut2 required for anaphase has two destruction boxes. The EMBO journal, 16(19), 5977–5987. <u>https://doi.org/10.1093/emboj/16.19.5977</u>

Galan, J. M., & Haguenauer-Tsapis, R. (1997). Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. The EMBO journal, 16(19), 5847–5854. https://doi.org/10.1093/emboj/16.19.5847

Gallego, C., Garí, E., Colomina, N., Herrero, E., & Aldea, M. (1997). The Cln3 cyclin is down-regulated by translational repression and degradation during the G1 arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast. The EMBO Journal, 16(23), 7196-7206. <u>https://doi.org/10.1093/emboj/16.23.7196</u>

Gan, B., Hu, J., Jiang, S., Liu, Y., Sahin, E., Zhuang, L., Fletcher-Sananikone, E., Colla, S., Wang, Y. A., Chin, L., & Depinho, R. A. (2010). Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. Nature, 468(7324), 701–704. <u>https://doi.org/10.1038/nature09595</u>

Gancedo J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 62(2), 334–361. <u>https://doi.org/10.1128/MMBR.62.2.334-361.1998</u>

Gandhi, R., Gillespie, P. J., & Hirano, T. (2006). Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase. Current biology : CB, 16(24), 2406–2417. <u>https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.061</u>

Garcia, P., Fernandez-Hernandez, R., Cuadrado, A., Coca, I., Gomez, A., Maqueda, M., Latorre-Pellicer, A., Puisac, B., Ramos, F. J., Sandoval, J., Esteller, M., Mosquera, J. L., Rodriguez, J., Pié, J., Losada, A., & Queralt, E. (2021). Disruption of NIPBL/Scc2 in Cornelia de Lange Syndrome provokes cohesin genome-wide redistribution with an impact in the transcriptome. Nature communications, 12(1), 4551. <u>https://doi.org/10.1038/s41467-021-24808-z</u>

IPANIPANIPANIPANIPANIPANIPANIPAN

Garcia-Luis, J., Bordelet, H., Thierry, A., Koszul, R., & Aragon, L. (2022). Depletion or cleavage of cohesin during anaphase differentially affects chromatin structure and segregation. eLife, 11, e80147. <u>https://doi.org/10.7554/eLife.80147</u>

García-Salcedo, R., Lubitz, T., Beltran, G., Elbing, K., Tian, Y., Frey, S., Wolkenhauer, O., Krantz, M., Klipp, E., & Hohmann, S. (2014). Glucose de-repression by yeast AMP-activated protein kinase SNF1 is controlled via at least two independent steps. The FEBS journal, 281(7), 1901–1917. <u>https://doi.org/10.1111/febs.12753</u>

Gardner, R., Putnam, C. W., & Weinert, T. (1999). RAD53, DUN1 and PDS1 define two parallel G2/M checkpoint pathways in budding yeast. The EMBO journal, 18(11), 3173–3185. <u>https://doi.org/10.1093/emboj/18.11.3173</u>

Garí, E., Volpe, T., Wang, H., Gallego, C., Futcher, B., & Aldea, M. (2001). Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin CLN3 to modulate cell fate in budding yeast. Genes & development, 15(21), 2803–2808. <u>https://doi.org/10.1101/gad.203501</u>

Gelot, C., Guirouilh-Barbat, J., & Lopez, B. S. (2016). The cohesin complex prevents the end-joining of distant DNA double-strand ends in S phase: Consequences on genome stability maintenance. Nucleus, 7(4), 339-345. <u>https://doi.org/10.1080/19491034.2</u> 016.1194159

Geymonat, M., Spanos, A., Smith, S. J., Wheatley, E., Rittinger, K., Johnston, L. H., & Sedgwick, S. G. (2002). Control of mitotic exit in budding yeast. In vitro regulation of Tem1 GTPase by Bub2 and Bfa1. The Journal of biological chemistry, 277(32), 28439–28445. https://doi.org/10.1074/jbc.M202540200

Gietz, R. D., & Schiestl, R. H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nature Protocols, 2(1), 31-34. <u>https://doi.org/10.1038/nprot.2007.13</u>

Gligoris, T., & Löwe, J. (2016). Structural Insights into Ring Formation of Cohes-

PANDADADADADADADADADADADADADADA

in and Related Smc Complexes. Trends in cell biology, 26(9), 680–693. <u>https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.04.002</u>

Gligoris, T. G., Scheinost, J. C., Bürmann, F., Petela, N., Chan, K. L., Uluocak, P., Beckouët, F., Gruber, S., Nasmyth, K., & Löwe, J. (2014). Closing the cohesin ring: structure and function of its Smc3-kleisin interface. Science (New York, N.Y.), 346(6212), 963–967. https://doi.org/10.1126/science.1256917

Gorr IH, Boos D, Stemmann O (2005) Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. Molecular Cell 19 (1):135–141. doi: 10.1016/j.mol-cel.2005.05.022

Grandin, N., & Reed, S. I. (1993). Differential function and expression of Saccharomyces cerevisiae B-type cyclins in mitosis and meiosis. Molecular and Cellular Biology, 13(4), Article 4. <u>https://doi.org/10.1128/mcb.13.4.2113</u>

Grether, M. E., & Herskowitz, I. (1999). Genetic and biochemical characterization of the yeast spo12 protein. Molecular biology of the cell, 10(11), 3689–3703. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.10.11.3689</u>

Gruber, S., Haering, C. H., & Nasmyth, K. (2003). Chromosomal cohesin forms a ring. Cell, 112(6), 765–777. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00162-4</u>

Guacci, V., Koshland, D., & Strunnikov, A. (1997). A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in S. cerevisiae. Cell, 91(1), Article 1. <u>https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)80008-8</u>

Guerfal, M., Claes, K., Knittelfelder, O., De Rycke, R., Kohlwein, S. D., & Callewaert, N. (2013). Enhanced membrane protein expression by engineering increased intracellular membrane production. Microbial Cell Factories, 12(1), 122. <u>https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-122</u>

Guillou, E., Ibarra, A., Coulon, V., Casado-Vela, J., Rico, D., Casal, I., Schwob, E., Losada, A., & Méndez, J. (2010). Cohesin organizes chromatin loops at DNA replication factories. Genes & development, 24(24), 2812–2822. https://doi.org/10.1101/gad.608210



IPANIPANIPANIPANIPANIPANIPANIPAN

Haber, J. E. (2012). Mating-Type Genes and MAT Switching in Saccharomyces cerevisiae. Genetics, 191(1), 33-64. <u>https://doi.org/10.1534/genetics.111.134577</u>

Haering, C. H., Farcas, A. M., Arumugam, P., Metson, J., & Nasmyth, K. (2008). The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. Nature, 454(7202), Article 7202.

Haering, C. H., Löwe, J., Hochwagen, A., & Nasmyth, K. (2002). Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. Molecular cell, 9(4), 773–788. <u>https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00515-4</u>

Hamid, T., & Kakar, S. S. (2004). PTTG/securin activates expression of p53 and modulates its function. Molecular cancer, 3, 18. <u>https://doi.org/10.1186/1476-4598-3-18</u>

Hardie, D. G., Carling, D., & Carlson, M. (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell?. Annual review of biochemistry, 67, 821–855. <u>https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.82</u> 1

Hartwell, L. H., & Unger, M. W. (1977). Unequal division in Saccharomyces cerevisiae and its implications for the control of cell division. The Journal of cell biology, 75(2 Pt 1), 422–435. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.75.2.422</u>

Hartwell, L. H., Culotti, J., Pringle, J. R., & Reid, B. J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. Science (New York, N.Y.), 183(4120), 46–51. <u>https://doi.org/10.1126/science.183.4120.46</u>

Hartwell, L. H., Mortimer, R. K., Culotti, J., & Culotti, M. (1973). Genetic control of the cell division cycle in yeast: V. Genetic analysis of cdc mutants. Genetics.

Harvey, S. L., Charlet, A., Haas, W., Gygi, S. P., & Kellogg, D. R. (2005). Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1. Cell, 122(3), Article 3. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.029</u>

Harvey, S. L., Enciso, G., Dephoure, N., Gygi, S. P., Gunawardena, J., & Kellogg, D. R. (2011). A phosphatase threshold sets the level of Cdk1 activity in early mitosis in budding yeast. Molecular biology of the cell, 22(19), 3595–3608. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.E11-04-0340</u>

A DAMPANDANDANDANDAN

Hassler, M., Shaltiel, I. A., Kschonsak, M., Simon, B., Merkel, F., Thärichen, L., Bailey, H. J., Macošek, J., Bravo, S., Metz, J., Hennig, J., & Haering, C. H. (2019). Structural Basis of an Asymmetric Condensin ATPase Cycle. Molecular Cell. <u>https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.037</u>

Hauf, S., Roitinger, E., Koch, B., Dittrich, C. M., Mechtler, K., & Peters, J. M. (2005). Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. PLoS biology, 3(3), e69. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030069</u>

Hedbacker, K., Hong, S. P., & Carlson, M. (2004). Pak1 protein kinase regulates activation and nuclear localization of Snf1-Gal83 protein kinase. Molecular and cellular biology, 24(18), 8255–8263. https://doi.org/10.1128/MCB.24.18.8255-8263.2004

Heidinger-Pauli, J. M., Mert, O., Davenport, C., Guacci, V., & Koshland, D. (2010). Systematic reduction of cohesin differentially affects chromosome segregation, condensation, and DNA repair. Current biology : CB, 20(10), 957–963. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>cub.2010.04.018</u>

Hein, J. B., Garvanska, D. H., Nasa, I., Kettenbach, A. N., & Nilsson, J. (2021). Coupling of Cdc20 inhibition and activation by BubR1. The Journal of cell biology, 220(5), e202012081. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.202012081</u>

Hellmuth S, Rata S, Brown A, Heidmann S, Novak B, Stemmann O (2015) Human chromosome segregation involves multi-layered regulation of separase by the peptidyl-prolyl-isomerase pin1. Mol Cell 58 (3):495–506. doi: 10.1016/j.molcel.2015.03.025

Hellmuth, S., Böttger, F., Pan, C., Mann, M., & Stemmann, O. (2014). PP2A delays AP-C/C-dependent degradation of separase-associated but not free securin. The EMBO Journal, 33(10), 1134-1147. <u>https://doi.org/10.1002/embj.201488098</u>



Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Höglund, P., Järvinen, H., Kristo, P., Pelin, K., Ridanpää, M., Salovaara, R., Toro, T., Bodmer, W., Olschwang, S., Olsen, A. S., ... Aaltonen, L. A. (1998). A serine/threonine kinase gene defective in Peutz–Jeghers syndrome. Nature, 391(6663), Article 6663. <u>https://doi.org/10.1038/34432</u>

TPAN IPAN IPAN IPAN IPAN IPAN IPAN

Hermanova, I., Zúñiga-García, P., Caro-Maldonado, A., Fernandez-Ruiz, S., Salvador, F., Martín-Martín, N., Zabala-Letona, A., Nuñez-Olle, M., Torrano, V., Camacho, L., Lizcano, J. M., Talamillo, A., Carreira, S., Gurel, B., Cortazar, A. R., Guiu, M., López, J. I., Martinez-Romero, A., Astobiza, I., Valcarcel-Jimenez, L., ... Carracedo, A. (2020). Genetic manipulation of LKB1 elicits lethal metastatic prostate cancer. The Journal of experimental medicine, 217(6), e20191787. <u>https://doi.org/10.1084/jem.20191787</u>

Herzog, F., Primorac, I., Dube, P., Lenart, P., Sander, B., Mechtler, K., Stark, H., & Peters, J. M. (2009). Structure of the anaphase-promoting complex/cyclosome interacting with a mitotic checkpoint complex. Science (New York, N.Y.), 323(5920), 1477–1481. https://doi.org/10.1126/science.1163300

Higuchi, T., & Uhlmann, F. (2005). Stabilization of microtubule dynamics at anaphase onset promotes chromosome segregation. Nature, 433(7022), 171–176. <u>https://doi.org/10.1038/nature03240</u>

Hilioti, Z., Chung, Y. S., Mochizuki, Y., Hardy, C. F., & Cohen-Fix, O. (2001). The anaphase inhibitor Pds1 binds to the APC/C-associated protein Cdc20 in a destruction box-dependent manner. Current biology : CB, 11(17), 1347–1352. <u>https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00399-2</u>

Holland, A. J., & Taylor, S. S. (2008). Many faces of separase regulation. SEB experimental biology series, 59, 99–112.

Holt, L. J., Krutchinsky, A. N., & Morgan, D. O. (2008). Positive feedback sharpens the anaphase switch. Nature, 454(7202), Article 7202. <u>https://doi.org/10.1038/na-ture07050</u>

Holt, L. J., Tuch, B. B., Villén, J., Johnson, A. D., Gygi, S. P., & Morgan, D. O. (2009). Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. Science (New York, N.Y.), 325(5948), 1682–1686. <u>https://doi.org/10.1126/sci-ence.1172867</u>

Hong, S. P., & Carlson, M. (2007). Regulation of snf1 protein kinase in response to environmental stress. The Journal of biological chemistry, 282(23), 16838–16845. https://doi.org/10.1074/jbc.M700146200

Hong, S. P., Leiper, F. C., Woods, A., Carling, D., & Carlson, M. (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(15), 8839–8843. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.1533136100</u>

Honigberg, S. (2016). Similar environments but diverse fates: Responses of budding yeast to nutrient deprivation. Microbial Cell, 3(8), 302-328. <u>https://doi.org/10.15698/mic2016.08.516</u>

Hornig, N. C., & Uhlmann, F. (2004). Preferential cleavage of chromatin-bound cohesin after targeted phosphorylation by Polo-like kinase. The EMBO journal, 23(15), 3144–3153. <u>https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600303</u>

Hornig, N. C., Knowles, P. P., McDonald, N. Q., & Uhlmann, F. (2002). The dual mechanism of separase regulation by securin. Current biology : CB, 12(12), 973–982. <u>https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00847-3</u>

Hovland, P. G., Tecklenberg, M., & Sclafani, R. A. (1997). Overexpression of the protein kinase Pak1 suppresses yeast DNA polymerase mutations. Molecular and General Genetics MGG, 256(1), 45-53. <u>https://doi.org/10.1007/s004380050544</u>

Hovsepian, J., Becuwe, M., Kleifeld, O., Glickman, M. H., & Léon, S. (2016). Studying Protein Ubiquitylation in Yeast. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 1449, 117–142. <u>https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3756-1_5</u>

Dong, S. M., Kim, K. M., Kim, S. Y., Shin, M. S., Na, E. Y., Lee, S. H., Park, W. S., Yoo, N. J., Jang, J. J., Yoon, C. Y., Kim, J. W., Kim, S. Y., Yang, Y. M., Kim, S. H., Kim, C. S., & Lee, J. Y. (1998). Frequent somatic mutations in serine/threonine kinase 11/Peutz-Jeghers syndrome gene in left-sided colon cancer. Cancer research, 58(17), 3787–3790.





Hu, F., Gan, Y., & Aparicio, O. M. (2008). Identification of Clb2 residues required for Swe1 regulation of Clb2-Cdc28 in Saccharomyces cerevisiae. Genetics, 179(2), 863–874. <u>https://doi.org/10.1534/genetics.108.086611</u>

Hu, L., Huang, T., Liu, X. J., & Cai, Y. D. (2011). Predicting protein phenotypes based on protein-protein interaction network. PloS one, 6(3), e17668. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017668</u>

Hu, F., Gan, Y., & Aparicio, O. M. (2008). Identification of Clb2 residues required for Swe1 regulation of Clb2-Cdc28 in Saccharomyces cerevisiae. Genetics, 179(2), 863–874. <u>https://doi.org/10.1534/genetics.108.086611</u>

Hu, F., Wang, Y., Liu, D., Li, Y., Qin, J., & Elledge, S. J. (2001). Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints. Cell, 107(5), 655–665. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00580-3</u>

Huang, J., & Moazed, D. (2003). Association of the RENT complex with nontranscribed and coding regions of rDNA and a regional requirement for the replication fork block protein Fob1 in rDNA silencing. Genes & development, 17(17), 2162–2176. <u>https://doi.org/10.1101/gad.1108403</u>

Inhibitors of separase, method for identifying them and uses (Patent CA2362794A). (2000). <u>https://patents.google.com/patent/CA2362794C</u>

Inoki, K., & Guan, K. L. (2006). Complexity of the TOR signaling network. Trends in cell biology, 16(4), 206–212. <u>https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.02.002</u>

Irniger, S., Piatti, S., Michaelis, C., & Nasmyth, K. (1995). Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. Cell, 81(2), 269–278. <u>https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90337-2</u>

Jabaiah, Abeer & Getz, Jennifer & Witkowski, Witold & Hardy, Jeanne & Daugherty, Patrick. (2012). Identification of protease exosite-interacting peptides that enhance sub-



strate cleavage kinetics. Biological chemistry. 393. 933-41. 10.1515/hsz-2012-0162.

Jackson, L. P., Reed, S. I., & Haase, S. B. (2006). Distinct mechanisms control the stability of the related S-phase cyclins Clb5 and Clb6. Molecular and cellular biology, 26(6), 2456–2466. <u>https://doi.org/10.1128/MCB.26.6.2456-2466.2006</u>

Jallepalli, P. V., Waizenegger, I. C., Bunz, F., Langer, S., Speicher, M. R., Peters, J. M., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Lengauer, C. (2001). Securin is required for chromosomal stability in human cells. Cell, 105(4), 445–457. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00340-3</u>

Jansen, M., Ten Klooster, J. P., Offerhaus, G. J., & Clevers, H. (2009). LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism. Physiological reviews, 89(3), 777–798. <u>https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2008</u>

Jaspersen, S. L., Charles, J. F., & Morgan, D. O. (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. Current biology : CB, 9(5), 227–236. <u>https://doi.org/10.1016/s0960-9822(99)80111-0</u>

Jaspersen, S. L., Charles, J. F., Tinker-Kulberg, R. L., & Morgan, D. O. (1998). A late mitotic regulatory network controlling cyclin destruction in Saccharomyces cerevisiae. Molecular biology of the cell, 9(10), 2803–2817. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.9.10.2803</u>

Jaspersen, S. L., & Morgan, D. O. (2000). Cdc14 activates cdc15 to promote mitotic exit in budding yeast. Current biology : CB, 10(10), 615–618. https://doi.org/10.1016/ s0960-9822(00)00491-7

Játiva, S., Calabria, I., Moyano-Rodriguez, Y., Garcia, P., & Queralt, E. (2019). Cdc14 activation requires coordinated Cdk1-dependent phosphorylation of Net1 and PP2A-Cdc55 at anaphase onset. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 76(18), 3601– 3620. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03086-5

Jenne, D. E., Reimann, H., Nezu, J., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Müller, O., Back, W., & Zimmer, M. (1998). Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. Nature genetics, 18(1), 38–43. <u>https://doi.org/10.1038/ng0198-38</u>

Jensen, S., Segal, M., Clarke, D. J., & Reed, S. I. (2001). A novel role of the budding yeast separin Esp1 in anaphase spindle elongation: evidence that proper spindle association of Esp1 is regulated by Pds1. The Journal of cell biology, 152(1), 27–40. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.152.1.27</u>

TPAN IPAN IPAN IPAN IPAN IPAN IPAN

Jensen, S., Geymonat, M., Johnson, A. L., Segal, M., & Johnston, L. H. (2002). Spatial regulation of the guanine nucleotide exchange factor Lte1 in Saccharomyces cerevisiae. Journal of cell science, 115(Pt 24), 4977–4991. <u>https://doi.org/10.1242/jcs.00189</u>

Jeppsson, K., Kanno, T., Shirahige, K., & Sjögren, C. (2014). The maintenance of chromosome structure: positioning and functioning of SMC complexes. Nature reviews. Molecular cell biology, 15(9), 601–614. <u>https://doi.org/10.1038/nrm3857</u>

Jiang, R., & Carlson, M. (1996). Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. Genes & development, 10(24), 3105–3115. <u>https://doi.org/10.1101/gad.10.24.3105</u>

Jin, F., Liu, H., Liang, F., Rizkallah, R., Hurt, M. M., & Wang, Y. (2008). Temporal control of the dephosphorylation of Cdk substrates by mitotic exit pathways in budding yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(42), 16177–16182. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.0808719105</u>

Johnson, D. G., & Walker, C. L. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. Annual review of pharmacology and toxicology, 39, 295–312. <u>https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.295</u>

Johnston, G. C., Ehrhardt, C. W., Lorincz, A., & Carter, B. L. (1979). Regulation of cell size in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Journal of bacteriology, 137(1), 1–5. <u>https://doi.org/10.1128/jb.137.1.1-5.1979</u>

Kaiser, P., Sia, R. A., Bardes, E. G., Lew, D. J., & Reed, S. I. (1998). Cdc34 and the F-box protein Met30 are required for degradation of the Cdk-inhibitory kinase Swe1. Genes & development, 12(16), 2587–2597. https://doi.org/10.1101/gad.12.16.2587

Kataria, M., & Yamano, H. (2019). Interplay between Phosphatases and the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome in Mitosis. Cells, 8(8), 814. <u>https://doi.</u>

org/10.3390/cells8080814

Kearsey S. E. (1987). Initiation of DNA replication in yeast chromosomes. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 317(1187), 517–523. <u>https://doi.org/10.1098/rstb.1987.0078</u>

Khondker, S., Kajjo, S., Chandler-Brown, D., Skotheim, J., Rudner, A., & Ikui, A. E. (2020). PP2ACdc55 dephosphorylates Pds1 and inhibits spindle elongation in S. cerevisiae. Journal of cell science, 133(14), jcs243766. <u>https://doi.org/10.1242/jcs.243766</u>

Kim, S., Lee, K., Bae, S. J., & Hahn, J. S. (2015). Promoters inducible by aromatic amino acids and γ -aminobutyrate (GABA) for metabolic engineering applications in Saccharomyces cerevisiae. Applied microbiology and biotechnology, 99(6), 2705–2714. https://doi.org/10.1007/s00253-014-6303-5

Kim, T., Lara-Gonzalez, P., Prevo, B., Meitinger, F., Cheerambathur, D. K., Oegema, K., & Desai, A. (2017). Kinetochores accelerate or delay APC/C activation by directing Cdc20 to opposing fates. Genes & development, 31(11), 1089–1094. <u>https://doi.org/10.1101/gad.302067.117</u>

Kim-Hellmuth, S., Aguet, F., Oliva, M., Muñoz-Aguirre, M., Kasela, S., Wucher, V., Castel, S. E., Hamel, A. R., Viñuela, A., Roberts, A. L., Mangul, S., Wen, X., Wang, G., Barbeira, A. N., Garrido-Martín, D., Nadel, B. B., Zou, Y., Bonazzola, R., Quan, J., Brown, A., ... Lappalainen, T. (2020). Cell type-specific genetic regulation of gene expression across human tissues. Science (New York, N.Y.), 369(6509), eaaz8528. <u>https://doi.org/10.1126/science.aaz8528</u>

Kitagawa, R., Bakkenist, C. J., McKinnon, P. J., & Kastan, M. B. (2004). Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. Genes & development, 18(12), 1423–1438. <u>https://doi.org/10.1101/gad.1200304</u>

Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J. P., Gannon, J., & Hunt, T. (1992). Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. Molecular biology of the cell, 3(11), 1279–1294. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.3.11.1279</u>

Koca Caydasi, Ayse & Ibrahim, Bashar & Pereira, Gislene. (2010). Monitoring spindle orientation: Spindle position checkpoint in charge. Cell division. 5. 28. 10.1186/1747-1028-5-28.

TPAN TPAN TPAN TPAN TPAN TPAN TPAN

Koch, C., Schleiffer, A., Ammerer, G., & Nasmyth, K. (1996). Switching transcription on and off during the yeast cell cycle: Cln/Cdc28 kinases activate bound transcription factor SBF (Swi4/Swi6) at start, whereas Clb/Cdc28 kinases displace it from the promoter in G2. Genes & development, 10(2), 129–141. <u>https://doi.org/10.1101/gad.10.2.129</u>

König, C., Maekawa, H., & Schiebel, E. (2010). Mutual regulation of cyclin-dependent kinase and the mitotic exit network. The Journal of cell biology, 188(3), 351–368. https://doi.org/10.1083/jcb.200911128

Kramer, E. R., Gieffers, C., Hölzl, G., Hengstschläger, M., & Peters, J. M. (1998). Activation of the human anaphase-promoting complex by proteins of the CDC20/Fizzy family. Current biology : CB, 8(22), 1207–1210. <u>https://doi.org/10.1016/s0960-9822(07)00510-6</u>

Kramer, E. R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., & Peters, J. M. (2000). Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. Molecular biology of the cell, 11(5), 1555–1569. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.11.5.1555</u>

Krantz, I. D., McCallum, J., DeScipio, C., Kaur, M., Gillis, L. A., Yaeger, D., Jukofsky, L., Wasserman, N., Bottani, A., Morris, C. A., Nowaczyk, M. J., Toriello, H., Bamshad, M. J., Carey, J. C., Rappaport, E., Kawauchi, S., Lander, A. D., Calof, A. L., Li, H. H., Devoto, M., ... Jackson, L. G. (2004). Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of Drosophila melanogaster Nipped-B. Nature genetics, 36(6), 631–635. https://doi.org/10.1038/ng1364

Kueng, S., Hegemann, B., Peters, B. H., Lipp, J. J., Schleiffer, A., Mechtler, K., & Peters, J. M. (2006). Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. Cell, 127(5), 955–967. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.040</u>

Kuilman, T., Maiolica, A., Godfrey, M., Scheidel, N., Aebersold, R., & Uhlmann, F. (2015). Identification of Cdk targets that control cytokinesis. The EMBO journal, 34(1), 81–96. https://doi.org/10.15252/embj.201488958

Kuilman, T., Velds, A., Kemper, K., Ranzani, M., Bombardelli, L., Hoogstraat, M., Nevedomskaya, E., Xu, G., de Ruiter, J., Lolkema, M. P., Ylstra, B., Jonkers, J., Rottenberg, S., Wessels, L. F., Adams, D. J., Peeper, D. S., & Krijgsman, O. (2015). CopywriteR: DNA copy number detection from off-target sequence data. Genome biology, 16(1), 49. <u>https:// doi.org/10.1186/s13059-015-0617-1</u>

Kumada, K., Nakamura, T., Nagao, K., Funabiki, H., Nakagawa, T., & Yanagida, M. (1998). Cut1 is loaded onto the spindle by binding to Cut2 and promotes anaphase spindle movement upon Cut2 proteolysis. Current biology : CB, 8(11), 633–641. <u>https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70250-7</u>

Kuragaki, C., Enomoto, T., Ueno, Y., Sun, H., Fujita, M., Nakashima, R., Ueda, Y., Wada, H., Murata, Y., Toki, T., Konishi, I., & Fujii, S. (2003). Mutations in the STK11 gene characterize minimal deviation adenocarcinoma of the uterine cervix. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 83(1), 35–45. <u>https://doi.org/10.1097/01.lab.0000049821.16698.d0</u>

Lai, C. S., Franke, T. F., & Gan, W. B. (2012). Opposite effects of fear conditioning and extinction on dendritic spine remodelling. Nature, 483(7387), 87–91. <u>https://doi.org/10.1038/nature10792</u>

Lanker, S., Valdivieso, M. H., & Wittenberg, C. (1996). Rapid degradation of the G1 cyclin Cln2 induced by CDK-dependent phosphorylation. Science (New York, N.Y.), 271(5255), 1597–1601. https://doi.org/10.1126/science.271.5255.1597

Laporte, D., Lebaudy, A., Sahin, A., Pinson, B., Ceschin, J., Daignan-Fornier, B., & Sagot, I. (2011). Metabolic status rather than cell cycle signals control quiescence entry and exit. The Journal of cell biology, 192(6), 949–957. https://doi.org/10.1083/jcb.201009028

Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G., & Taylor, S. S. (2012). The spindle assembly checkpoint. Current biology : CB, 22(22), R966–R980. <u>https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.006</u>



Lazar-Stefanita, L., Scolari, V. F., Mercy, G., Muller, H., Guérin, T. M., Thierry, A., Mozziconacci, J., & Koszul, R. (2017). Cohesins and condensins orchestrate the 4D dynamics of yeast chromosomes during the cell cycle. The EMBO journal, 36(18), 2684–2697. https://doi.org/10.15252/embj.201797342

IPANIPANIPANIPANIPANIPANIPAN

Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., & Hempstead, B. L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. Science (New York, N.Y.), 294(5548), 1945–1948. https://doi.org/10.1126/science.1065057

Lee, S. E., Frenz, L. M., Wells, N. J., Johnson, A. L., & Johnston, L. H. (2001). Order of function of the budding-yeast mitotic exit-network proteins Tem1, Cdc15, Mob1, Dbf2, and Cdc5. Current biology : CB, 11(10), 784–788. <u>https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00228-7</u>

Lees, E. M., & Harlow, E. (1993). Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. Molecular and cellular biology, 13(2), 1194–1201. <u>https://doi.org/10.1128/mcb.13.2.1194-1201.1993</u>

Lénárt, P., Petronczki, M., Steegmaier, M., Di Fiore, B., Lipp, J. J., Hoffmann, M., Rettig, W. J., Kraut, N., & Peters, J. M. (2007). The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. Current biology : CB, 17(4), 304–315. https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.12.046

Lengronne, A., McIntyre, J., Katou, Y., Kanoh, Y., Hopfner, K. P., Shirahige, K., & Uhlmann, F. (2006). Establishment of sister chromatid cohesion at the S. cerevisiae replication fork. Molecular cell, 23(6), 787–799. <u>https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.08.018</u>

Lew, D. J., & Reed, S. I. (1993). Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. The Journal of cell biology, 120(6), 1305–1320. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.120.6.1305</u>

Liang, E. F., Lim, S. Z., Tam, W. W., Ho, C. S., Zhang, M. W., McIntyre, R. S., & Ho, R. C. (2018). The Effect of Methylphenidate and Atomoxetine on Heart Rate and Systolic Blood Pressure in Young People and Adults with Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): Systematic Review, Meta-Analysis, and Meta-Regression. International journal of environmental research and public health, 15(8), 1789. <u>https://doi.</u>



org/10.3390/ijerph15081789

Liang, S., Zheng, D., Standley, D. M., Guo, H., & Zhang, C. (2013). A novel function prediction approach using protein overlap networks. BMC systems biology, 7, 61. <u>https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-61</u>

Liang, F., Zhang, Y., Li, L., Yang, Y., Fei, J.F., Liu, Y., Qin, W. (2022) SpG and SpRY variants expand the CRISPR toolbox for genome editing in zebrafish. Nature communications. 13:3421.

Lianga, N., Doré, C., Kennedy, E. K., Yeh, E., Williams, E. C., Fortinez, C. M., Wang, A., Bloom, K. S., & Rudner, A. D. (2018). Cdk1 phosphorylation of Esp1/Separase functions with PP2A and Slk19 to regulate pericentric Cohesin and anaphase onset. PLoS genetics, 14(3), e1007029. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007029</u>

Lim, H. H., Goh, P. Y., & Surana, U. (1998). Cdc20 is essential for the cyclosome-mediated proteolysis of both Pds1 and Clb2 during M phase in budding yeast. Current biology : CB, 8(4), 231–234. <u>https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70088-0</u>

Lin, Z., Luo, X., & Yu, H. (2016). Structural basis of cohesin cleavage by separase. Nature, 532(7597), 131–134. <u>https://doi.org/10.1038/nature17402</u>

Litwin, H., Erlich, B., & Dunsky, A. (2018). The Complex Association Between Fear of Falling and Mobility Limitation in Relation to Late-Life Falls: A SHARE-Based Analysis. Journal of aging and health, 30(6), 987–1008. <u>https://doi.org/10.1177/0898264317704096</u>

Lizcano, J. M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N. A., Boudeau, J., Hawley, S. A., Udd, L., Mäkelä, T. P., Hardie, D. G., & Alessi, D. R. (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. The EMBO journal, 23(4), 833–843. <u>https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600110</u>

Longhese, M. P., Foiani, M., Muzi-Falconi, M., Lucchini, G., & Plevani, P. (1998). DNA damage checkpoint in budding yeast. The EMBO journal, 17(19), 5525–5528. <u>https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5525</u>



BIBLIOGRAFÍA

Lord, P. G., & Wheals, A. E. (1983). Rate of cell cycle initiation of yeast cells when cell size is not a rate-determining factor. Journal of cell science, 59, 183–201. <u>https://doi.org/10.1242/jcs.59.1.183</u>

TPAN TPAN TPAN TPAN TPAN TPAN TPAN

Losada, A., Hirano, M., & Hirano, T. (1998). Identification of Xenopus SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. Genes & development, 12(13), 1986– 1997. <u>https://doi.org/10.1101/gad.12.13.1986</u>

Lu, A., Magupalli, V. G., Ruan, J., Yin, Q., Atianand, M. K., Vos, M. R., Schröder, G. F., Fitzgerald, K. A., Wu, H., & Egelman, E. H. (2014). Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. Cell, 156(6), 1193–1206. <u>https:// doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.008</u>

Luo, S., & Tong, L. (2017). Molecular mechanism for the regulation of yeast separase by securin. Nature, 542(7640), Article 7640. <u>https://doi.org/10.1038/nature21061</u>

Luo, S., & Tong, L. (2018). Structural biology of the separase-securin complex with crucial roles in chromosome segregation. Current opinion in structural biology, 49, 114–122. <u>https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.01.012</u>

Luo, S., & Tong, L. (2021). Structure and Function of the Separase-Securin Complex. Sub-cellular biochemistry, 96, 217–232. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-030-58971-4_4</u>

Maekawa, H., Priest, C., Lechner, J., Pereira, G., & Schiebel, E. (2007). The yeast centrosome translates the positional information of the anaphase spindle into a cell cycle signal. The Journal of cell biology, 179(3), 423–436. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.200705197</u>

Mah, A. S., Jang, J., & Deshaies, R. J. (2001). Protein kinase Cdc15 activates the Dbf2-Mob1 kinase complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(13), 7325–7330. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.141098998</u>

Mah, A. S., Elia, A. E., Devgan, G., Ptacek, J., Schutkowski, M., Snyder, M., Yaffe, M. B., & Deshaies, R. J. (2005). Substrate specificity analysis of protein kinase complex Dbf2-Mob1 by peptide library and proteome array screening. BMC biochemistry, 6, 22.



https://doi.org/10.1186/1471-2091-6-22

Maier, N. K., Ma, J., Lampson, M. A., & Cheeseman, I. M. (2021). Separase cleaves the kinetochore protein Meikin at the meiosis I/II transition. Developmental cell, 56(15), 2192–2206.e8. <u>https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.06.019</u>

Manzano-López, & Monje-Casas, Fernando. (2020). The Multiple Roles of the Cdc14 Phosphatase in Cell Cycle Control. International Journal of Molecular Sciences. 21. 709. 10.3390/ijms21030709.

Matsumoto, S., Iwakawa, R., Takahashi, K., Kohno, T., Nakanishi, Y., Matsuno, Y., Suzuki, K., Nakamoto, M., Shimizu, E., Minna, J. D., & Yokota, J. (2007). Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. Oncogene, 26(40), 5911–5918. <u>https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210418</u>

Mcaleenan, Alexandra & Clemente-Blanco, Andres & Cordon-Preciado, Violeta & Sen, Nicholas & Esteras, Miguel & Jarmuz, Adam & Aragón, Luis. (2012). Post-replicative repair involves separase-dependent removal of the kleisin subunit of cohesin. Nature. 493. 10.1038/nature11630.

McCartney, R. R., Rubenstein, E. M., & Schmidt, M. C. (2005). Snf1 kinase complexes with different beta subunits display stress-dependent preferences for the three Snf1-activating kinases. Current genetics, 47(6), 335–344. <u>https://doi.org/10.1007/s00294-005-0576-2</u>

McCartney, R. R., & Schmidt, M. C. (2001). Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. The Journal of biological chemistry, 276(39), 36460–36466. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M104418200</u>

McGrew, J. T., Goetsch, L., Byers, B., & Baum, P. (1992). Requirement for ESP1 in the nuclear division of Saccharomyces cerevisiae. Molecular biology of the cell, 3(12), 1443–1454. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.3.12.1443</u>



McGuinness, B. E., Hirota, T., Kudo, N. R., Peters, J. M., & Nasmyth, K. (2005). Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. PLoS biology, 3(3), e86. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030086</u>

IPANIPANIPANIPANIPANIPANIPAN

McMillan, J. N., Sia, R. A., & Lew, D. J. (1998). A morphogenesis checkpoint monitors the actin cytoskeleton in yeast. The Journal of cell biology, 142(6), 1487–1499. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.142.6.1487</u>

McMillan, J. N., Theesfeld, C. L., Harrison, J. C., Bardes, E. S. G. G., & Lew, D. J. (2002). Determinants of Swe1p degradation in Saccharomyces cerevisiae. Molecular Biology of the Cell, 13(10), Article 10. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.e02-05-0283</u>

Mehenni, H., Gehrig, C., Nezu, J., Oku, A., Shimane, M., Rossier, C., Guex, N., Blouin, J. L., Scott, H. S., & Antonarakis, S. E. (1998). Loss of LKB1 kinase activity in Peutz-Jeghers syndrome, and evidence for allelic and locus heterogeneity. American journal of human genetics, 63(6), 1641–1650. <u>https://doi.org/10.1086/302159</u>

Meitinger, F., Petrova, B., Lombardi, I. M., Bertazzi, D. T., Hub, B., Zentgraf, H., & Pereira, G. (2010). Targeted localization of Inn1, Cyk3 and Chs2 by the mitotic-exit network regulates cytokinesis in budding yeast. Journal of cell science, 123(Pt 11), 1851–1861. https://doi.org/10.1242/jcs.063891

Melesse, M., Bembenek, J. N., & Zhulin, I. B. (2018). Conservation of the separase regulatory domain. Biology direct, 13(1), 7. <u>https://doi.org/10.1186/s13062-018-0210-0</u>

Meyer, R., Fofanov, V., Panigrahi, A., Merchant, F., Zhang, N., & Pati, D. (2009). Overexpression and mislocalization of the chromosomal segregation protein separase in multiple human cancers. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 15(8), 2703–2710. <u>https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2454</u>

Michaelis, C., Ciosk, R., & Nasmyth, K. (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. Cell, 91(1), 35–45. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)80007-6</u>

Miles, S., Li, L., Davison, J., & Breeden, L. L. (2013). Xbp1 directs global repression of budding yeast transcription during the transition to quiescence and is important for the longevity and reversibility of the quiescent state. PLoS genetics, 9(10), e1003854. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003854

A DAMPANDANDANDANDANDAN

Miller, D. P., Hall, H., Chaparian, R., Mara, M., Mueller, A., Hall, M. C., & Shannon, K. B. (2015). Dephosphorylation of Iqg1 by Cdc14 regulates cytokinesis in budding yeast. Molecular biology of the cell, 26(16), 2913–2926. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.E14-12-1637</u>

Miller, M. E., & Cross, F. R. (2000). Distinct subcellular localization patterns contribute to functional specificity of the Cln2 and Cln3 cyclins of Saccharomyces cerevisiae. Molecular and cellular biology, 20(2), 542–555. <u>https://doi.org/10.1128/MCB.20.2.542-555.2000</u>

Miller, M. E., & Cross, F. R. (2001). Mechanisms controlling subcellular localization of the G(1) cyclins Cln2p and Cln3p in budding yeast. Molecular and cellular biology, 21(18), 6292–6311. <u>https://doi.org/10.1128/MCB.21.18.6292-6311.2001</u>

Mirchenko, L., & Uhlmann, F. (2010). Sli15(INCENP) dephosphorylation prevents mitotic checkpoint reengagement due to loss of tension at anaphase onset. Current biology : CB, 20(15), 1396–1401. <u>https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.023</u>

Mizunuma, M., Ogawa, T., Koyama, T., Shitamukai, A., Tsubakiyama, R., Komaruyama, T., Yamaguchi, T., Kume, K., & Hirata, D. (2013). Evidence of antagonistic regulation of restart from G(1) delay in response to osmotic stress by the Hog1 and Whi3 in budding yeast. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 77(10), 2002–2007. <u>https://doi.org/10.1271/bbb.130260</u>

Mocciaro, A., & Schiebel, E. (2010). Cdc14: a highly conserved family of phosphatases with non-conserved functions?. Journal of cell science, 123(Pt 17), 2867–2876. https://doi.org/10.1242/jcs.074815

Mohl, D. A., Huddleston, M. J., Collingwood, T. S., Annan, R. S., & Deshaies, R. J. (2009). Dbf2-Mob1 drives relocalization of protein phosphatase Cdc14 to the cytoplasm during exit from mitosis. The Journal of cell biology, 184(4), 527–539. <u>https://doi.</u>



org/10.1083/jcb.200812022

TOUNDON DON DON

Molk, J. N., Schuyler, S. C., Liu, J. Y., Evans, J. G., Salmon, E. D., Pellman, D., & Bloom, K. (2004). The differential roles of budding yeast Tem1p, Cdc15p, and Bub2p protein dynamics in mitotic exit. Molecular biology of the cell, 15(4), 1519–1532. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.e03-09-0708</u>

Moll, G. N., Konings, W. N., & Driessen, A. J. (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. Antonie van Leeuwenhoek, 76(1-4), 185–198.

Moreno-Torres, M., Jaquenoud, M., & De Virgilio, C. (2015). TORC1 controls G1-S cell cycle transition in yeast via Mpk1 and the greatwall kinase pathway. Nature communications, 6, 8256. <u>https://doi.org/10.1038/ncomms9256</u>

Moretto, F., Sagot, I., Daignan-Fornier, B., & Pinson, B. (2013). A pharmaco-epistasis strategy reveals a new cell size controlling pathway in yeast. Molecular systems biology, 9, 707. <u>https://doi.org/10.1038/msb.2013.60</u>

Morgan D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. Annual review of cell and developmental biology, 13, 261–291. <u>https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.261</u>

Moyano-Rodríguez, Y., Vaquero, D., Vilalta-Castany, O., Foltman, M., Sanchez-Diaz, A., & Queralt, E. (2022). PP2A-Cdc55 phosphatase regulates actomyosin ring contraction and septum formation during cytokinesis. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 79(3), 165. <u>https://doi.org/10.1007/s00018-022-04209-1</u>

Mukherjee, M., Byrd, T., Brawley, V. S., Bielamowicz, K., Li, X. N., Merchant, F., Maitra, S., Sumazin, P., Fuller, G., Kew, Y., Sun, D., Powell, S. Z., Ahmed, N., Zhang, N., & Pati, D. (2014). Overexpression and constitutive nuclear localization of cohesin protease Separase protein correlates with high incidence of relapse and reduced overall survival in glioblastoma multiforme. Journal of neuro-oncology, 119(1), 27–35. <u>https://doi.</u>



org/10.1007/s11060-014-1458-6

Mukherjee, M., Ge, G., Zhang, N., Edwards, D. G., Sumazin, P., Sharan, S. K., Rao, P. H., Medina, D., & Pati, D. (2014). MMTV-Espl1 transgenic mice develop aneuploid, estrogen receptor alpha (ERα)-positive mammary adenocarcinomas. Oncogene, 33(48), 5511–5522. <u>https://doi.org/10.1038/onc.2013.493</u>

Mukherjee, T., Kim, W. S., Mandal, L., & Banerjee, U. (2011). Interaction between Notch and Hif-alpha in development and survival of Drosophila blood cells. Science (New York, N.Y.), 332(6034), 1210–1213. <u>https://doi.org/10.1126/science.1199643</u>

Murayama, Y., & Uhlmann, F. (2014). Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring. Nature, 505(7483), 367–371. <u>https://doi.org/10.1038/nature12867</u>

Murayama, Y., & Uhlmann, F. (2015). DNA Entry into and Exit out of the Cohesin Ring by an Interlocking Gate Mechanism. Cell, 163(7), 1628–1640. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.030</u>

Musacchio A. (2011). Spindle assembly checkpoint: the third decade. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 366(1584), 3595–3604. <u>https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0072</u>

Musio, A., Montagna, C., Mariani, T., Tilenni, M., Focarelli, M. L., Brait, L., Indino, E., Benedetti, P. A., Chessa, L., Albertini, A., Ried, T., & Vezzoni, P. (2005). SMC1 involvement in fragile site expression. Human molecular genetics, 14(4), 525–533. <u>https://doi.org/10.1093/hmg/ddi049</u>

Nagao, K., Adachi, Y., & Yanagida, M. (2004). Separase-mediated cleavage of cohesin at interphase is required for DNA repair. Nature, 430(7003), 1044–1048. <u>https://doi.org/10.1038/nature02803</u>



Nakada, D., Saunders, T. L., & Morrison, S. J. (2010). Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. Nature, 468(7324), 653–658. <u>https://doi.org/10.1038/nature09571</u>

Nakagawa, A., Nakashima, T., Taniguchi, M., Hosaka, H., Kimura, M., & Tanaka, I. (1999). The three-dimensional structure of the RNA-binding domain of ribosomal protein L2; a protein at the peptidyl transferase center of the ribosome. The EMBO journal, 18(6), 1459–1467. <u>https://doi.org/10.1093/emboj/18.6.1459</u>

Nakamura, T., Nagao, K., Nakaseko, Y., & Yanagida, M. (2002). Cut1/separase C-terminus affects spindle pole body positioning in interphase of fission yeast: pointed nuclear formation. Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms, 7(11), 1113–1124. <u>https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2002.00586.x</u>

Nash, R., Tokiwa, G., Anand, S., Erickson, K., & Futcher, A. B. (1988). The WHI1+ gene of Saccharomyces cerevisiae tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. The EMBO journal, 7(13), 4335–4346. <u>https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.</u> tb03332.x

Nasmyth, K., & Dirick, L. (1991). The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast. Cell, 66(5), 995–1013. <u>https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90444-4</u>

Nasmyth, K., & Haering, C. H. (2005). The structure and function of SMC and kleisin complexes. Annual review of biochemistry, 74, 595–648. <u>https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133219</u>

Nasmyth K. (1996). At the heart of the budding yeast cell cycle. Trends in genetics : TIG, 12(10), 405–412. <u>https://doi.org/10.1016/0168-9525(96)10041-x</u>

Nath, N., McCartney, R. R., & Schmidt, M. C. (2003). Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. Molecular and cellular biology, 23(11), 3909–3917. <u>https://doi.org/10.1128/MCB.23.11.3909-3917.2003</u>

Nath, U., Crawford, B. C., Carpenter, R., & Coen, E. (2003). Genetic control of surface curvature. Science (New York, N.Y.), 299(5611), 1404–1407. <u>https://doi.org/10.1126/science.1079354</u>

Newlon, C. S., Collins, I., Dershowitz, A., Deshpande, A. M., Greenfeder, S. A., Ong, L. Y., & Theis, J. F. (1993). Analysis of replication origin function on chromosome III of Saccharomyces cerevisiae. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, 58, 415–423. <u>https://doi.org/10.1101/sqb.1993.058.01.048</u>

Nigg, E. A., & Holland, A. J. (2018). Once and only once: mechanisms of centriole duplication and their deregulation in disease. Nature reviews. Molecular cell biology, 19(5), 297–312. <u>https://doi.org/10.1038/nrm.2017.127</u>

Nilsson, J., Yekezare, M., Minshull, J., & Pines, J. (2008). The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction. Nature cell biology, 10(12), 1411–1420. <u>https://doi.org/10.1038/ncb1799</u>

Nishiyama, A., Yamaguchi, L., Sharif, J., Johmura, Y., Kawamura, T., Nakanishi, K., Shimamura, S., Arita, K., Kodama, T., Ishikawa, F., Koseki, H., & Nakanishi, M. (2013). Uhrf1-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication. Nature, 502(7470), 249–253. <u>https://doi.org/10.1038/nature12488</u>

Nishiyama, T., Ladurner, R., Schmitz, J., Kreidl, E., Schleiffer, A., Bhaskara, V., Bando, M., Shirahige, K., Hyman, A. A., Mechtler, K., & Peters, J. M. (2010). Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. Cell, 143(5), 737–749. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.031</u>

Nishizawa, K., Freund, C., Li, J., Wagner, G., & Reinherz, E. L. (1998). Identification of a proline-binding motif regulating CD2-triggered T lymphocyte activation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(25), 14897–14902. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14897</u>

Nolen, B., Taylor, S., & Ghosh, G. (2004). Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. Molecular cell, 15(5), 661–675. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.024



Noor, Agha & Hameed, Ather & Bhatti, Kouser & Tunio, Sarfraz. (2003). Bio-ethanol Fermentation by the Bioconversion of Sugar from Dates by Saccharomyces cerevisiae Strains ASN-3 and HA-4. Biotechnology. 10.3923/biotech.2003.8.17.

IPANIPANIPANIPANIPANIPANIPAN

Nurse P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. Nature, 344(6266), 503–508. <u>https://doi.org/10.1038/344503a0</u>

Orlicky, S., Tang, X., Willems, A., Tyers, M., & Sicheri, F. (2003). Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. Cell, 112(2), 243–256. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00034-5</u>

Pal, G., Paraz, M. T., & Kellogg, D. R. (2008). Regulation of Mih1/Cdc25 by protein phosphatase 2A and casein kinase 1. The Journal of cell biology, 180(5), 931–945. <u>https:// doi.org/10.1083/jcb.200711014</u>

Palani, S., Meitinger, F., Boehm, M. E., Lehmann, W. D., & Pereira, G. (2012). Cdc14-dependent dephosphorylation of Inn1 contributes to Inn1-Cyk3 complex formation. Journal of cell science, 125(Pt 13), 3091–3096. <u>https://doi.org/10.1242/jcs.106021</u>

Parkes, V., & Johnston, L. H. (1992). SPO12 and SIT4 suppress mutations in DBF2, which encodes a cell cycle protein kinase that is periodically expressed. Nucleic acids research, 20(21), 5617–5623. <u>https://doi.org/10.1093/nar/20.21.5617</u>

Patterson, K. I., Brummer, T., O'Brien, P. M., & Daly, R. J. (2009). Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. The Biochemical journal, 418(3), 475–489. <u>https://doi.org/10.1042/bj20082234</u>

Pearson, C. G., Maddox, P. S., Salmon, E. D., & Bloom, K. (2001). Budding yeast chromosome structure and dynamics during mitosis. The Journal of cell biology, 152(6), 1255–1266. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.152.6.1255</u>

Pei, L., & Melmed, S. (1997). Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). Molecular endocrinology (Baltimore, Md.), 11(4), 433–441. https://doi.org/10.1210/mend.11.4.9911 Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., & Gygi, S. P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. Nature biotechnology, 21(8), 921–926. <u>https://doi.org/10.1038/nbt849</u>

ADAMPANDANDANDANDANDAN

Pereira, G., & Schiebel, E. (2003). Separase regulates INCENP-Aurora B anaphase spindle function through Cdc14. Science (New York, N.Y.), 302(5653), 2120–2124. <u>https://doi.org/10.1126/science.1091936</u>

Pereira, G., & Schiebel, E. (2005). Kin4 kinase delays mitotic exit in response to spindle alignment defects. Molecular cell, 19(2), 209–221. <u>https://doi.org/10.1016/j.mol-cel.2005.05.030</u>

Pereira, G., Höfken, T., Grindlay, J., Manson, C., & Schiebel, E. (2000). The Bub2p spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit. Molecular cell, 6(1), 1–10.

Pereira, G., Manson, C., Grindlay, J., & Schiebel, E. (2002). Regulation of the Bfa1p-Bub2p complex at spindle pole bodies by the cell cycle phosphatase Cdc14p. The Journal of cell biology, 157(3), 367–379. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.200112085</u>

Peters J. M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. Nature reviews. Molecular cell biology, 7(9), 644–656. <u>https://doi.org/10.1038/nrm1988</u>

Pfleger, C. M., & Kirschner, M. W. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. Genes & development, 14(6), 655–665.

Piché, J., Gosset, N., Legault, L. M., Pacis, A., Oneglia, A., Caron, M., Chetaille, P., Barreiro, L., Liu, D., Qi, X., Nattel, S., Leclerc, S., Breton-Larrivée, M., CoHEART Consortium, Mc-Graw, S., & Andelfinger, G. (2019). Molecular Signature of CAID Syndrome: Noncanonical Roles of SGO1 in Regulation of TGF- β Signaling and Epigenomics. Cellular and molecular gastroenterology and hepatology, 7(2), 411–431. <u>https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.10.011</u>

Pigula, A., Drubin, D. G., & Barnes, G. (2014). Regulation of mitotic spindle disassembly by an environmental stress-sensing pathway in budding yeast. Genetics, 198(3), 1043–1057. <u>https://doi.org/10.1534/genetics.114.163238</u>



Platara, M., Ruiz, A., Serrano, R., Palomino, A., Moreno, F., & Ariño, J. (2006). The transcriptional response of the yeast Na(+)-ATPase ENA1 gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. The Journal of biological chemistry, 281(48), 36632–36642. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M606483200</u>

ADDA DA MDA MDA MDA MDA MDA MDA MDA

Portillo, F., Mulet, J. M., & Serrano, R. (2005). A role for the non-phosphorylated form of yeast Snf1: tolerance to toxic cations and activation of potassium transport. FEBS letters, 579(2), 512–516. <u>https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.019</u>

Powers, B. L., & Hall, M. C. (2017). Re-examining the role of Cdc14 phosphatase in reversal of Cdk phosphorylation during mitotic exit. Journal of cell science, 130(16), 2673–2681. <u>https://doi.org/10.1242/jcs.201012</u>

Queralt, E., & Igual, J. C. (2004). Functional distinction between Cln1p and Cln2p cyclins in the control of the Saccharomyces cerevisiae mitotic cycle. Genetics, 168(1), 129–140. <u>https://doi.org/10.1534/genetics.104.029587</u>

Queralt, E., & Uhlmann, F. (2008). Cdk-counteracting phosphatases unlock mitotic exit. Current opinion in cell biology, 20(6), 661–668. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>ceb.2008.09.003</u>

Queralt, E., & Uhlmann, F. (2008). Separase cooperates with Zds1 and Zds2 to activate Cdc14 phosphatase in early anaphase. The Journal of cell biology, 182(5), 873–883. https://doi.org/10.1083/jcb.200801054

Queralt, E., Lehane, C., Novak, B., & Uhlmann, F. (2006). Downregulation of PP2A(C-dc55) phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast. Cell, 125(4), 719–732. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.038</u>

Rankin, S., Ayad, N. G., & Kirschner, M. W. (2005). Sororin, a substrate of the anaphase-promoting complex, is required for sister chromatid cohesion in verte-brates. Molecular cell, 18(2), 185–200. <u>https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.017</u>

Reinders, J., Wagner, K., Zahedi, R. P., Stojanovski, D., Eyrich, B., van der Laan, M., Rehling, P., Sickmann, A., Pfanner, N., & Meisinger, C. (2007). Profiling phosphoproteins of yeast mitochondria reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase. Mo-
lecular & cellular proteomics : MCP, 6(11), 1896–1906. https://doi.org/10.1074/mcp. M700098-MCP200

Richardson, H., Lew, D. J., Henze, M., Sugimoto, K., & Reed, S. I. (1992). Cyclin-B homologs in Saccharomyces cerevisiae function in S phase and in G2. Genes & Development, 6(11), Article 11. https://doi.org/10.1101/gad.6.11.2021

Richmond, D., Rizkallah, R., Liang, F., Hurt, M. M., & Wang, Y. (2013). Slk19 clusters kinetochores and facilitates chromosome bipolar attachment. Molecular biology of the cell, 24(5), 566-577. https://doi.org/10.1091/mbc.E12-07-0552

Robellet, X., Thattikota, Y., Wang, F., Wee, T. L., Pascariu, M., Shankar, S., Bonneil, É., Brown, C. M., & D'Amours, D. (2015). A high-sensitivity phospho-switch triggered by Cdk1 governs chromosome morphogenesis during cell division. Genes & development, 29(4), 426-439. https://doi.org/10.1101/gad.253294.114

Rock, J. M., & Amon, A. (2011). Cdc15 integrates Tem1 GTPase-mediated spatial signals with Polo kinase-mediated temporal cues to activate mitotic exit. Genes & development, 25(18), 1943-1954. https://doi.org/10.1101/gad.17257711

Rodriguez-Nieto, S., & Sanchez-Cespedes, M. (2009). BRG1 and LKB1: tales of two tumor suppressor genes on chromosome 19p and lung cancer. Carcinogenesis, 30(4), 547-554. https://doi.org/10.1093/carcin/bgp035

Rodriguez-Rodriguez, J. A., Moyano, Y., Játiva, S., & Queralt, E. (2016). Mitotic Exit Function of Polo-like Kinase Cdc5 Is Dependent on Sequential Activation by Cdk1. Cell reports, 15(9), 2050–2062. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.079

Rolef Ben-Shahar, T., Heeger, S., Lehane, C., East, P., Flynn, H., Skehel, M., & Uhlmann, F. (2008). Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. Science (New York, N.Y.), 321(5888), 563–566. https://doi.org/10.1126/ science.1157774

Manzoni, R., Montani, F., Visintin, C., Caudron, F., Ciliberto, A., & Visintin, R. (2010). Oscillations in Cdc14 release and sequestration reveal a circuit underlying mitotic exit. The Journal of cell biology, 190(2), 209–222. https://doi.org/10.1083/jcb.201002026



Rosen, L. E., Klebba, J. E., Asfaha, J. B., Ghent, C. M., Campbell, M. G., Cheng, Y., & Morgan, D. O. (2019). Cohesin cleavage by separase is enhanced by a substrate motif distinct from the cleavage site. Nature Communications, 10(1), Article 1. <u>https://doi.org/10.1038/s41467-019-13209-y</u>

ADDA DA MDA MDA MDA MDA MDA MDA MDA

Rubenstein, E. M., McCartney, R. R., & Schmidt, M. C. (2006). Regulatory domains of Snf1-activating kinases determine pathway specificity. Eukaryotic cell, 5(4), 620–627. https://doi.org/10.1128/EC.5.4.620-627.2006

Rudner, A. D., & Murray, A. W. (2000). Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. The Journal of cell biology, 149(7), 1377–1390. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.149.7.1377</u>

Rudner, A. D., Hardwick, K. G., & Murray, A. W. (2000). Cdc28 activates exit from mitosis in budding yeast. The Journal of cell biology, 149(7), 1361–1376. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.149.7.1361</u>

Ryan, K. J., White, C. C., Patel, K., Xu, J., Olah, M., Replogle, J. M., Frangieh, M., Cimpean, M., Winn, P., McHenry, A., Kaskow, B. J., Chan, G., Cuerdon, N., Bennett, D. A., Boyd, J. D., Imitola, J., Elyaman, W., De Jager, P. L., & Bradshaw, E. M. (2017). A human microglia-like cellular model for assessing the effects of neurodegenerative disease gene variants. Science translational medicine, 9(421), eaai7635. <u>https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aai7635</u>

Salehi, F., Kovacs, K., Scheithauer, B. W., Lloyd, R. V., & Cusimano, M. (2008). Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update. Endocrine-related cancer, 15(3), 721–743. <u>https://doi.org/10.1677/ERC-08-0012</u>

Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., Liu, D., Tetzlaff, M., & Elledge, S. J. (1999). Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. Science (New York, N.Y.), 286(5442), 1166–1171. <u>https://doi.org/10.1126/science.286.5442.1166</u>

Sanchez-Cespedes, M., Parrella, P., Esteller, M., Nomoto, S., Trink, B., Engles, J. M., Westra, W. H., Herman, J. G., & Sidransky, D. (2002). Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. Cancer research, 62(13), 3659–3662.

Sanchez-Diaz, A., Nkosi, P. J., Murray, S., & Labib, K. (2012). The Mitotic Exit Network and Cdc14 phosphatase initiate cytokinesis by counteracting CDK phosphorylations and blocking polarised growth. The EMBO journal, 31(17), 3620–3634. https://doi. org/10.1038/emboj.2012.224

A DAMPANDANDANDANDANDAN

Santos Velázquez, A.I.d.l., García de Oya, I., Manzano López, J. y Monje Casas, F. (2017). Late rDNA Condensation Ensures Timely Cdc14 Release and Coordination of Mitotic Exit Signaling with Nucleolar Segregation. Current Biology, 27 (21), 3249-3263.

Sato, M., Fujisaki, S., Sato, K., Nishimura, Y., & Nakano, A. (2001). Yeast Saccharomyces cerevisiae has two cis-prenyltransferases with different properties and localizations. Implication for their distinct physiological roles in dolichol synthesis. Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms, 6(6), 495–506. <u>https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00438.x</u>

Saunders W. S. (2002). The FEAR factor. Molecular cell, 9(2), 207–209. <u>https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00460-4</u>

Schalbetter, S. A., Goloborodko, A., Fudenberg, G., Belton, J. M., Miles, C., Yu, M., Dekker, J., Mirny, L., & Baxter, J. (2017). SMC complexes differentially compact mitotic chromosomes according to genomic context. Nature cell biology, 19(9), 1071–1080. <u>https://doi.org/10.1038/ncb3594</u>

Schmidt, M. C., & McCartney, R. R. (2000). beta-subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition. The EMBO journal, 19(18), 4936–4943. https://doi.org/10.1093/emboj/19.18.4936

Schmitz, J., Watrin, E., Lénárt, P., Mechtler, K., & Peters, J. M. (2007). Sororin is required for stable binding of cohesin to chromatin and for sister chromatid cohesion in interphase. Current biology : CB, 17(7), 630–636. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> <u>cub.2007.02.029</u>

Schmoller, K. M., Turner, J. J., Kõivomägi, M., & Skotheim, J. M. (2015). Dilution of the cell cycle inhibitor Whi5 controls budding-yeast cell size. Nature, 526(7572), 268–272. <u>https://doi.org/10.1038/nature14908</u>



Schneider, H., Pitossi, F., Balschun, D., Wagner, A., del Rey, A., & Besedovsky, H. O. (1998). A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(13), 7778–7783. https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7778

Schwab, M., Lutum, A. S., & Seufert, W. (1997). Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. Cell, 90(4), 683–693. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80529-2</u>

Schwob, E., & Nasmyth, K. (1993). CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in Saccharomyces cerevisiae. Genes & development, 7(7A), 1160–1175. <u>https://doi.org/10.1101/gad.7.7a.1160</u>

Schwob, E., Böhm, T., Mendenhall, M. D., & Nasmyth, K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in S. cerevisiae. Cell, 79(2), 233– 244. <u>https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90193-7</u>

Seitan, V. C., Banks, P., Laval, S., Majid, N. A., Dorsett, D., Rana, A., Smith, J., Bateman, A., Krpic, S., Hostert, A., Rollins, R. A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Benard, C. Y., Hekimi, S., Newbury, S. F., & Strachan, T. (2006). Metazoan Scc4 homologs link sister chromatid cohesion to cell and axon migration guidance. PLoS biology, 4(8), e242. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040242

Seshan, A., & Amon, A. (2005). Ras and the Rho effector Cla4 collaborate to target and anchor Lte1 at the bud cortex. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 4(7), 940–946. <u>https://doi.org/10.4161/cc.4.7.1785</u>

Seshan, A., Bardin, A. J., & Amon, A. (2002). Control of Lte1 localization by cell polarity determinants and Cdc14. Current biology : CB, 12(24), 2098–2110. <u>https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01388-x</u>

Shackelford, D. B., & Shaw, R. J. (2009). The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. Nature reviews. Cancer, 9(8), 563–575. https://doi.org/10.1038/nrc2676 Shaw, R. J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R. L., Witters, L. A., DePinho, R. A., & Cantley, L. C. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(10), 3329–3335. https://doi.org/10.1073/pnas.0308061100

Shepard, J. L., Amatruda, J. F., Finkelstein, D., Ziai, J., Finley, K. R., Stern, H. M., Chiang, K., Hersey, C., Barut, B., Freeman, J. L., Lee, C., Glickman, J. N., Kutok, J. L., Aster, J. C., & Zon, L. I. (2007). A mutation in separase causes genome instability and increased susceptibility to epithelial cancer. Genes & development, 21(1), 55–59. <u>https://doi.org/10.1101/gad.1470407</u>

Shindo, N., Kumada, K., & Hirota, T. (2012). Separase sensor reveals dual roles for separase coordinating cohesin cleavage and cdk1 inhibition. Developmental cell, 23(1), 112–123. <u>https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.06.015</u>

Shirayama, M., Zachariae, W., Ciosk, R., & Nasmyth, K. (1998). The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in Saccharomyces cerevisiae. The EMBO journal, 17(5), 1336–1349. <u>https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1336</u>

Shou, W., & Deshaies, R. J. (2002). Multiple telophase arrest bypassed (tab) mutants alleviate the essential requirement for Cdc15 in exit from mitosis in S. cerevisiae. BMC genetics, 3, 4. <u>https://doi.org/10.1186/1471-2156-3-4</u>

Shou, W., Seol, J. H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z. W., Jang, J., Shevchenko, A., Charbonneau, H., & Deshaies, R. J. (1999). Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. Cell, 97(2), 233–244. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80733-3</u>

Shteinberg, M., Protopopov, Y., Listovsky, T., Brandeis, M., & Hershko, A. (1999). Phosphorylation of the cyclosome is required for its stimulation by Fizzy/cdc20. Biochemical and biophysical research communications, 260(1), 193–198. <u>https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0884</u>

Sia, R. A., Bardes, E. S., & Lew, D. J. (1998). Control of Swe1p degradation by the morpho-



genesis checkpoint. The EMBO journal, 17(22), 6678–6688. <u>https://doi.org/10.1093/</u> emboj/17.22.6678

IDAMPANDAMPANDAMPANDAMPAN

Sia, R. A., Herald, H. A., & Lew, D. J. (1996). Cdc28 tyrosine phosphorylation and the morphogenesis checkpoint in budding yeast. Molecular biology of the cell, 7(11), 1657–1666. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.7.11.1657</u>

Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., & Meisinger, C. (2003). The proteome of Saccharomyces cerevisiae mitochondria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(23), 13207–13212. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.2135385100</u>

Siegmund, R. F., & Nasmyth, K. A. (1996). The Saccharomyces cerevisiae Start-specific transcription factor Swi4 interacts through the ankyrin repeats with the mitotic Clb2/Cdc28 kinase and through its conserved carboxy terminus with Swi6. Molecular and cellular biology, 16(6), 2647–2655. <u>https://doi.org/10.1128/MCB.16.6.2647</u>

Simonetta, M., Manzoni, R., Mosca, R., Mapelli, M., Massimiliano, L., Vink, M., Novak, B., Musacchio, A., & Ciliberto, A. (2009). The influence of catalysis on mad2 activation dynamics. PLoS biology, 7(1), e10. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000010</u>

Simpson-Lavy, K. J., Zenvirth, D., & Brandeis, M. (2015). Phosphorylation and dephosphorylation regulate APC/C(Cdh1) substrate degradation. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 14(19), 3138–3145. <u>https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1078036</u>

Skibbens, R. V., Corson, L. B., Koshland, D., & Hieter, P. (1999). Ctf7p is essential for sister chromatid cohesion and links mitotic chromosome structure to the DNA replication machinery. Genes & development, 13(3), 307–319. <u>https://doi.org/10.1101/gad.13.3.307</u>

Skotheim, J. M., Di Talia, S., Siggia, E. D., & Cross, F. R. (2008). Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. Nature, 454(7202), 291–296. <u>https://doi.org/10.1038/nature07118</u>

Skowyra, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J., & Harper, J. W. (1997). F-box proteins

are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. Cell, 91(2), 209–219. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80403-1

Smets, B., Ghillebert, R., De Snijder, P., Binda, M., Swinnen, E., De Virgilio, C., & Winderickx, J. (2010). Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in Saccharomyces cerevisiae. Current genetics, 56(1), 1–32. <u>https://doi.org/10.1007/</u> <u>s00294-009-0287-1</u>

Sofueva, S., Yaffe, E., Chan, W. C., Georgopoulou, D., Vietri Rudan, M., Mira-Bontenbal, H., Pollard, S. M., Schroth, G. P., Tanay, A., & Hadjur, S. (2013). Cohesin-mediated interactions organize chromosomal domain architecture. The EMBO journal, 32(24), 3119–3129. <u>https://doi.org/10.1038/emboj.2013.237</u>

Sonoda, E., Matsusaka, T., Morrison, C., Vagnarelli, P., Hoshi, O., Ushiki, T., Nojima, K., Fukagawa, T., Waizenegger, I. C., Peters, J. M., Earnshaw, W. C., & Takeda, S. (2001). Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells. Developmental cell, 1(6), 759–770. <u>https://doi.org/10.1016/s1534-5807(01)00088-0</u>

Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown, P. O., Botstein, D., & Futcher, B. (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast Saccharomyces cerevisiae by microarray hybridization. Molecular biology of the cell, 9(12), 3273–3297. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.9.12.3273</u>

Stegmeier, F., Huang, J., Rahal, R., Zmolik, J., Moazed, D., & Amon, A. (2004). The replication fork block protein Fob1 functions as a negative regulator of the FEAR network. Current biology : CB, 14(6), 467–480. <u>https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.03.009</u>

Stegmeier, F., Visintin, R., & Amon, A. (2002). Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. Cell, 108(2), 207–220. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00618-9</u>

Stemmann, O., Zou, H., Gerber, S. A., Gygi, S. P., & Kirschner, M. W. (2001). Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. Cell, 107(6), 715–726. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00603-1</u>



Straight, A. F., Shou, W., Dowd, G. J., Turck, C. W., Deshaies, R. J., Johnson, A. D., & Moazed, D. (1999). Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. Cell, 97(2), 245–256. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80734-5</u>

ADDA DA MDA MDA MDA MDA MDA MDA MDA

Stratmann, R., & Lehner, C. F. (1996). Separation of sister chromatids in mitosis requires the Drosophila pimples product, a protein degraded after the metaphase/anaphase transition. Cell, 84(1), 25–35. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80990-3</u>

Stuart, D., & Wittenberg, C. (1995). CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells. Genes & development, 9(22), 2780–2794. https://doi.org/10.1101/gad.9.22.2780

Stuart, D., & Wittenberg, C. (1998). CLB5 and CLB6 are required for premeiotic DNA replication and activation of the meiotic S/M checkpoint. Genes & development, 12(17), 2698–2710. <u>https://doi.org/10.1101/gad.12.17.2698</u>

Su, G. H., Hruban, R. H., Bansal, R. K., Bova, G. S., Tang, D. J., Shekher, M. C., Westerman, A. M., Entius, M. M., Goggins, M., Yeo, C. J., & Kern, S. E. (1999). Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. The American journal of pathology, 154(6), 1835–1840. <u>https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65440-5</u>

Sudakin, V., Chan, G. K., & Yen, T. J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. The Journal of cell biology, 154(5), 925–936. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.200102093</u>

Sullivan, M., & Morgan, D. O. (2007). Finishing mitosis, one step at a time. Nature reviews. Molecular cell biology, 8(11), 894–903. <u>https://doi.org/10.1038/nrm2276</u>

Sullivan, M., & Uhlmann, F. (2003). A non-proteolytic function of separase links the onset of anaphase to mitotic exit. Nature cell biology, 5(3), 249–254. <u>https://doi.org/10.1038/ncb940</u>

Sullivan, M., Hornig, N. C., Porstmann, T., & Uhlmann, F. (2004). Studies on substrate recognition by the budding yeast separase. The Journal of biological chemistry, 279(2),

1191-1196. https://doi.org/10.1074/jbc.M309761200

Sullivan, M., Lehane, C., & Uhlmann, F. (2001). Orchestrating anaphase and mitotic exit: separase cleavage and localization of Slk19. Nature cell biology, 3(9), 771–777. https://doi.org/10.1038/ncb0901-771

Sumara, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B. H., & Peters, J. M. (2000). Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. The Journal of cell biology, 151(4), 749–762. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.151.4.749</u>

Sumara, I., Vorlaufer, E., Stukenberg, P. T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E. A., & Peters, J. M. (2002). The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. Molecular cell, 9(3), 515–525. <u>https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00473-2</u>

Sun, Y., Kucej, M., Fan, H. Y., Yu, H., Sun, Q. Y., & Zou, H. (2009). Separase is recruited to mitotic chromosomes to dissolve sister chromatid cohesion in a DNA-dependent manner. Cell, 137(1), 123–132. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.040</u>

Sutherland, C. M., Hawley, S. A., McCartney, R. R., Leech, A., Stark, M. J., Schmidt, M. C., & Hardie, D. G. (2003). Elm1p is one of three upstream kinases for the Saccharomyces cerevisiae SNF1 complex. Current biology : CB, 13(15), 1299–1305. <u>https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00459-7</u>

Tamborrini, D., Juanes, M. A., Ibanes, S., Rancati, G., & Piatti, S. (2018). Recruitment of the mitotic exit network to yeast centrosomes couples septin displacement to actomyosin constriction. Nature communications, 9(1), 4308. <u>https://doi.org/10.1038/</u> <u>s41467-018-06767-0</u>

Tanaka, T. U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M. J., & Nasmyth, K. (2002). Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. Cell, 108(3), 317–329. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00633-5</u>

Tanaka, T., Fuchs, J., Loidl, J., & Nasmyth, K. (2000). Cohesin ensures bipolar attachment of microtubules to sister centromeres and resists their precocious separation. Nature





cell biology, 2(8), 492-499. https://doi.org/10.1038/35019529

Teichner, A., Eytan, E., Sitry-Shevah, D., Miniowitz-Shemtov, S., Dumin, E., Gromis, J., & Hershko, A. (2011). P31comet Promotes disassembly of the mitotic checkpoint complex in an ATP-dependent process. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(8), Article 8. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.1100023108</u>

Thomas-Claudepierre, A. S., Schiavo, E., Heyer, V., Fournier, M., Page, A., Robert, I., & Reina-San-Martin, B. (2013). The cohesin complex regulates immunoglobulin class switch recombination. The Journal of experimental medicine, 210(12), 2495–2502. https://doi.org/10.1084/jem.20130166

Thompson-Jaeger, S., François, J., Gaughran, J. P., & Tatchell, K. (1991). Deletion of SNF1 affects the nutrient response of yeast and resembles mutations which activate the adenylate cyclase pathway. Genetics, 129(3), 697–706. <u>https://doi.org/10.1093/genetics/129.3.697</u>

Thornton, B. R., Ng, T. M., Matyskiela, M. E., Carroll, C. W., Morgan, D. O., & Toczyski, D. P. (2006). An architectural map of the anaphase-promoting complex. Genes & development, 20(4), 449–460. <u>https://doi.org/10.1101/gad.1396906</u>

Tinker-Kulberg, R. L., & Morgan, D. O. (1999). Pds1 and Esp1 control both anaphase and mitotic exit in normal cells and after DNA damage. Genes & development, 13(15), 1936–1949. <u>https://doi.org/10.1101/gad.13.15.1936</u>

Tkach, J. M., Yimit, A., Lee, A. Y., Riffle, M., Costanzo, M., Jaschob, D., Hendry, J. A., Ou, J., Moffat, J., Boone, C., Davis, T. N., Nislow, C., & Brown, G. W. (2012). Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. Nature cell biology, 14(9), 966–976. <u>https://doi.org/10.1038/ncb2549</u>

Toczyski, D. P., Galgoczy, D. J., & Hartwell, L. H. (1997). CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. Cell, 90(6), 1097–1106. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80375-x</u> Tokiwa, G., Tyers, M., Volpe, T. and Futcher, B., (1994). Inhibition of G1 cyclin activity by the Ras/cAMP pathway in yeast. Nature 371, 342–345.

Tomonaga, T., Nagao, K., Kawasaki, Y., Furuya, K., Murakami, A., Morishita, J., Yuasa, T., Sutani, T., Kearsey, S. E., Uhlmann, F., Nasmyth, K., & Yanagida, M. (2000). Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. Genes & development, 14(21), 2757–2770. <u>https://doi.org/10.1101/gad.832000</u>

Tompa, P., Dosztanyi, Z., & Simon, I. (2006). Prevalent structural disorder in E. coli and S. cerevisiae proteomes. Journal of proteome research, 5(8), 1996–2000. <u>https://doi.org/10.1021/pr0600881</u>

Tomson, B. N., Rahal, R., Reiser, V., Monje-Casas, F., Mekhail, K., Moazed, D., & Amon, A. (2009). Regulation of Spo12 phosphorylation and its essential role in the FEAR network. Current Biology, 19(6), Article 6. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.024

Toone, W. M., Aerne, B. L., Morgan, B. A., & Johnston, L. H. (1997). Getting started: regulating the initiation of DNA replication in yeast. Annual review of microbiology, 51, 125–149. <u>https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.125</u>

Torres-Rosell, J., Machín, F., Jarmuz, A., & Aragón, L. (2004). Nucleolar segregation lags behind the rest of the genome and requires Cdc14p activation by the FEAR network. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 3(4), 496–502.

Tóth, A., Ciosk, R., Uhlmann, F., Galova, M., Schleiffer, A., & Nasmyth, K. (1999). Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. Genes & development, 13(3), 320–333. <u>https://doi.org/10.1101/gad.13.3.320</u>

Traverso, E. E., Baskerville, C., Liu, Y., Shou, W., James, P., Deshaies, R. J., & Charbonneau, H. (2001). Characterization of the Net1 cell cycle-dependent regulator of the Cdc14 phosphatase from budding yeast. The Journal of biological chemistry, 276(24), 21924–21931. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M011689200</u>

Tyers, M., Tokiwa, G., & Futcher, B. (1993). Comparison of the Saccharomyces cerevisi-



BIBLIOGRAFÍA

ae G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. The EMBO journal, 12(5), 1955–1968. <u>https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.</u> tb05845.x

A PANDAN PANDAN PANDAN PANDAN

Tyson, J. J., Chen, K., & Novak, B. (2001). Network dynamics and cell physiology. Nature reviews. Molecular cell biology, 2(12), 908–916. <u>https://doi.org/10.1038/35103078</u>

Tyson, J. J., Novak, B., Chen, K., & Val, J. (1995). Checkpoints in the cell cycle from a modeler's perspective. Progress in cell cycle research, 1, 1–8. <u>https://doi.org/10.1007/978-</u> <u>1-4615-1809-9_1</u>

Uhlmann, F., & Nasmyth, K. (1998). Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. Current biology : CB, 8(20), 1095–1101. <u>https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70463-4</u>

Uhlmann, F., Lottspeich, F., & Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. Nature, 400(6739), 37–42. <u>https://doi.org/10.1038/21831</u>

Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M. A., Koonin, E. V., & Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. Cell, 103(3), 375–386. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00130-6</u>

Unal, E., Heidinger-Pauli, J. M., Kim, W., Guacci, V., Onn, I., Gygi, S. P., & Koshland, D. E. (2008). A molecular determinant for the establishment of sister chromatid cohesion. Science (New York, N.Y.), 321(5888), 566–569. <u>https://doi.org/10.1126/science.1157880</u>

Usaite, R., Jewett, M. C., Oliveira, A. P., Yates, J. R., 3rd, Olsson, L., & Nielsen, J. (2009). Reconstruction of the yeast Snf1 kinase regulatory network reveals its role as a global energy regulator. Molecular systems biology, 5, 319. <u>https://doi.org/10.1038/</u> msb.2009.67

Varetti, G., & Musacchio, A. (2008). The spindle assembly checkpoint. Current biology : CB, 18(14), R591–R595. <u>https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.06.012</u>

Vega, H., Waisfisz, Q., Gordillo, M., Sakai, N., Yanagihara, I., Yamada, M., van Gosliga, D., Kayserili, H., Xu, C., Ozono, K., Jabs, E. W., Inui, K., & Joenje, H. (2005). Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. Nature genetics, 37(5), 468–470. <u>https://doi.org/10.1038/ng1548</u>

ADAMPANDANDANDANDANDAN

Vergés, E., Colomina, N., Garí, E., Gallego, C., & Aldea, M. (2007). Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry. Molecular cell, 26(5), 649–662. <u>https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.023</u>

Verma, R., Feldman, R. M., & Deshaies, R. J. (1997). SIC1 is ubiquitinated in vitro by a pathway that requires CDC4, CDC34, and cyclin/CDK activities. Molecular biology of the cell, 8(8), 1427–1437. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.8.8.1427</u>

Vertegaal A. C. O. (2022). Signalling mechanisms and cellular functions of SUMO. Nature reviews. Molecular cell biology, 23(11), 715–731. <u>https://doi.org/10.1038/s41580-022-00500-y</u>

Viadiu, H., Stemmann, O., Kirschner, M. W., & Walz, T. (2005). Domain structure of separase and its binding to securin as determined by EM. Nature structural & molecular biology, 12(6), 552–553. <u>https://doi.org/10.1038/nsmb935</u>

Villoria, M. T., Ramos, F., Dueñas, E., Faull, P., Cutillas, P. R., & Clemente-Blanco, A. (2017). Stabilization of the metaphase spindle by Cdc14 is required for recombinational DNA repair. The EMBO Journal. <u>https://doi.org/10.15252/embj.201593540</u>

Visintin, I., Feng, Z., Longton, G., Ward, D. C., Alvero, A. B., Lai, Y., Tenthorey, J., Leiser, A., Flores-Saaib, R., Yu, H., Azori, M., Rutherford, T., Schwartz, P. E., & Mor, G. (2008). Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 14(4), 1065–1072. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1569

Visintin, R., Craig, K., Hwang, E. S., Prinz, S., Tyers, M., & Amon, A. (1998). The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. Molecular cell, 2(6), 709–718. <u>https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80286-5</u> Visintin, R., & Amon, A. (2001). Regulation of the mitotic exit protein kinases Cdc15 and Dbf2. Molecular biology of the cell, 12(10), 2961–2974. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.12.10.2961</u>

Visintin, R., Hwang, E. S., & Amon, A. (1999). Cfi 1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. Nature, 398(6730), Article 6730. <u>https://doi.org/10.1038/19775</u>

Visintin, R., Prinz, S., & Amon, A. (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. Science (New York, N.Y.), 278(5337), 460–463. <u>https://doi.org/10.1126/science.278.5337.460</u>

Visintin, R., Stegmeier, F., & Amon, A. (2003). The role of the polo kinase Cdc5 in controlling Cdc14 localization. Molecular biology of the cell, 14(11), 4486–4498. <u>https:// doi.org/10.1091/mbc.e03-02-0095</u>

Waizenegger, I. C., Giménez-Abián, J. F., Wernic, D., & Peters, J.-M. (2002). Regulation of Human Separase by Securin Binding and Autocleavage. Current Biology, 12(16), 1368-1378. <u>https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01073-4</u>

Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A., & Peters, J. M. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. Cell, 103(3), 399–410. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00132-x

Walters, A. D., May, C. K., Dauster, E. S., Cinquin, B. P., Smith, E. A., Robellet, X., D'Amours, D., Larabell, C. A., & Cohen-Fix, O. (2014). The Yeast Polo Kinase Cdc5 Regulates the Shape of the Mitotic Nucleus. Current Biology, 24(23), 2861-2867. <u>https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.029</u>

Wang, H., Liu, D., Wang, Y., Qin, J., & Elledge, S. J. (2001). Pds1 phosphorylation in response to DNA damage is essential for its DNA damage checkpoint function. Genes & Development, 15(11), 1361-1372. <u>https://doi.org/10.1101/gad.893201</u>

Wang, L., Yang, X., Jiang, H.-Y., Song, Z.-M., Lin, X., Hu, X.-P., & Li, C.-F. (2022). Protein kinases Elm1 and Sak1 of Saccharomyces cerevisiae exerted different functions un-

PANDADADADADADADADADADADADADADADA

der high-glucose and heat shock stresses. Applied Microbiology and Biotechnology, 106(5), 2029-2042. <u>https://doi.org/10.1007/s00253-022-11840-2</u>

Wang, Y., & Ng, T.-Y. Y. (2006). Phosphatase 2A negatively regulates mitotic exit in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Biol. Cell, 17(1), Article 1. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.</u> <u>E04-12-1109</u>

Wang, Y., Hu, F., & Elledge, S. J. (2000). The Bfa1/Bub2 GAP complex comprises a universal checkpoint required to prevent mitotic exit. Current Biology. <u>https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00779-X</u>

Wäsch, R., & Cross, F. R. (2002). APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. Nature, 418(6897), 556–562. <u>https://doi.org/10.1038/nature00856</u>

Watrin, E., Schleiffer, A., Tanaka, K., Eisenhaber, F., Nasmyth, K., & Peters, J. M. (2006). Human Scc4 Is Required for Cohesin Binding to Chromatin, Sister-Chromatid Cohesion, and Mitotic Progression. Current Biology. <u>https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.03.049</u>

Wei, C., Amos, C. I., Stephens, L. C., Campos, I., Deng, J. M., Behringer, R. R., Rashid, A., & Frazier, M. L. (2005). Mutation of Lkb1 and p53 genes exert a cooperative effect on tumorigenesis. Cancer research, 65(24), 11297–11303. <u>https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0716</u>

Wei, C., Bhattaram, V. K., Igwe, J. C., Fleming, E., & Tirnauer, J. S. (2012). The LKB1 Tumor Suppressor Controls Spindle Orientation and Localization of Activated AMPK in Mitotic Epithelial Cells. PLOS ONE, 7(7), e41118. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041118</u>

Wei, W., Nurse, P., & Broek, D. (1993). Yeast cells can enter a quiescent state through G1, S, G2, or M phase of the cell cycle. Cancer research, 53(8), 1867–1870.

Whalen, J., Sniffen, C., Gartland, S., Vannini, M., & Seshan, A. (2018). Budding Yeast BFA1 Has Multiple Positive Roles in Directing Late Mitotic Events. G3 (Bethesda, Md.), 8(11), 3397–3410. <u>https://doi.org/10.1534/g3.118.200672</u> Wijnen, H., Landman, A., & Futcher, B. (2002). The G(1) cyclin Cln3 promotes cell cycle entry via the transcription factor Swi6. Molecular and cellular biology, 22(12), 4402–4418. <u>https://doi.org/10.1128/MCB.22.12.4402-4418.2002</u>

Wilson, W. A., Hawley, S. A., & Hardie, D. G. (1996). Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. Current biology : CB, 6(11), 1426–1434. <u>https://doi.org/10.1016/s0960-9822(96)00747-6</u>

Wingo, S. N., Gallardo, T. D., Akbay, E. A., Liang, M. C., Contreras, C. M., Boren, T., Shimamura, T., Miller, D. S., Sharpless, N. E., Bardeesy, N., Kwiatkowski, D. J., Schorge, J. O., Wong, K. K., & Castrillon, D. H. (2009). Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression. PloS one, 4(4), e5137. <u>https://doi.org/10.1371/journal.</u> <u>pone.0005137</u>

Winter, A., Schmid, R., & Bayliss, R. (2015). Structural Insights into Separase Architecture and Substrate Recognition through Computational Modelling of Caspase-Like and Death Domains. PLoS computational biology, 11(10), e1004548. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004548</u>

Wolfe, B. A., & Gould, K. L. (2005). Split decisions: coordinating cytokinesis in yeast. Trends in cell biology, 15(1), 10–18. <u>https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.11.006</u>

Wood, N. E., Kositangool, P., Hariri, H., Marchand, A. J., & Henne, W. M. (2020). Nutrient Signaling, Stress Response, and Inter-organelle Communication Are Non-canonical Determinants of Cell Fate. Cell reports, 33(9), 108446. <u>https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108446</u>

Woodbury, E. L., & Morgan, D. O. (2007). Cdk and APC activities limit the spindle-stabilizing function of Fin1 to anaphase. Nature Cell Biology, 9(1), Article 1. https://doi. org/ncb1523 [pii] 10.1038/ncb1523

Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., & Carling, D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. Current biology : CB, 13(22), 2004–2008. https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.031 Wu, S., Scheible, W. R., Schindelasch, D., Van Den Daele, H., De Veylder, L., & Baskin, T. I. (2010). A conditional mutation in Arabidopsis thaliana separase induces chromosome non-disjunction, aberrant morphogenesis and cyclin B1;1 stability. Development (Cambridge, England), 137(6), 953–961. <u>https://doi.org/10.1242/dev.041939</u>

ADAM DAM DAM DAM DAM DAM

Yaakov, G., Thorn, K., & Morgan, D. O. (2012). Separase Biosensor Reveals that Cohesin Cleavage Timing Depends on Phosphatase PP2ACdc55 Regulation. Developmental Cell, 23(1), 124-136. <u>https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.06.007</u>

Yahya, G., Parisi, E., Flores, A., Gallego, C., & Aldea, M. (2014). A Whi7-anchored loop controls the G1 Cdk-cyclin complex at start. Molecular cell, 53(1), 115–126. <u>https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.015</u>

Yam, C. Q. X., Chia, D. B., Shi, I., Lim, H. H., & Surana, U. (2020). Dun1, a Chk2-related kinase, is the central regulator of securin-separase dynamics during DNA damage signaling. Nucleic Acids Research, 48(11), 6092-6107. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gkaa355</u>

Yamada, C., Morooka, A., Miyazaki, S., Nagai, M., Mase, S., Iemura, K., Tasnin, M. N., Takuma, T., Nakamura, S., Morshed, S., Koike, N., Mostofa, M. G., Rahman, M. A., Sharmin, T., Katsuta, H., Ohara, K., Tanaka, K., & Ushimaru, T. (2021). TORC1 inactivation promotes APC/C-dependent mitotic slippage in yeast and human cells. iScience, 25(2), 103675. <u>https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103675</u>

Yamada, H., Kumada, K., & Yanagida, M. (1997). Distinct subunit functions and cell cycle regulated phosphorylation of 20S APC/cyclosome required for anaphase in fission yeast. Journal of cell science, 110 (Pt 15), 1793–1804. <u>https://doi.org/10.1242/jcs.110.15.1793</u>

Yamamoto, A., Guacci, V., & Koshland, D. (1996). Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, Saccharomyces cerevisiae. The Journal of cell biology, 133(1), 85–97. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.133.1.85</u>

Yang, H., Jiang, W., Gentry, M., & Hallberg, R. L. (2000). Loss of a protein phosphatase 2A regulatory subunit (Cdc55p) elicits improper regulation of Swe1p degradation. Molecular and cellular biology, 20(21), 8143–8156. <u>https://doi.org/10.1128/</u>





MCB.20.21.8143-8156.2000

Yeh, E., Skibbens, R. V., Cheng, J. W., Salmon, E. D., & Bloom, K. (1995). Spindle dynamics and cell cycle regulation of dynein in the budding yeast, Saccharomyces cerevisiae. The Journal of cell biology, 130(3), 687–700. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.130.3.687</u>

Yellman, C. M., & Roeder, G. S. (2015). Cdc14 Early Anaphase Release, FEAR, Is Limited to the Nucleus and Dispensable for Efficient Mitotic Exit. PloS one, 10(6), e0128604. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128604

Yeong, F. M., Lim, H. H., Padmashree, C. G., & Surana, U. (2000). Exit from Mitosis in Budding Yeast. Molecular Cell. <u>https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80444-x</u>

Yoshida, S., & Toh-e, A. (2001). Regulation of the localization of Dbf2 and mob1 during cell division of saccharomyces cerevisiae. Genes and Genetic Systems, 76(2), Article 2. https://doi.org/10.1266/ggs.76.141

Yoshida, S., & Toh-e, A. (2002). Budding yeast Cdc5 phosphorylates Net1 and assists Cdc14 release from the nucleolus. Biochemical and Biophysical Research Communications, 294(3), Article 3. <u>https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00544-2</u>

Yoshida, S., Asakawa, K., & Toh-e, A. (2002). Mitotic exit network controls the localization of Cdc14 to the spindle pole body in Saccharomyces cerevisiae. Current biology : CB, 12(11), 944–950. <u>https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00870-9</u>

Young, E. T., Kacherovsky, N., & Van Riper, K. (2002). Snf1 protein kinase regulates Adr1 binding to chromatin but not transcription activation. The Journal of biological chemistry, 277(41), 38095–38103. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M206158200</u>

Yu, J., Raia, P., Ghent, C. M., Raisch, T., Sadian, Y., Cavadini, S., Sabale, P. M., Barford, D., Raunser, S., Morgan, D. O., & Boland, A. (2021). Structural basis of human separase regulation by securin and CDK1–cyclin B1. Nature, 596(7870), Article 7870. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03764-0

Yu, Z. K., Geyer, R. K., & Maki, C. G. (2000). MDM2-dependent ubiquitination of nuclear and cytoplasmic P53. Oncogene, 19(51), 5892–5897. <u>https://doi.org/10.1038/</u>

<u>sj.onc.1203980</u>

Zachariae, W., & Nasmyth, K. (1996). TPR proteins required for anaphase progression mediate ubiquitination of mitotic B-type cyclins in yeast. Molecular biology of the cell, 7(5), 791–801. <u>https://doi.org/10.1091/mbc.7.5.791</u>

Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K., & Seufert, W. (1998). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. Science (New York, N.Y.), 282(5394), 1721–1724. <u>https://doi.org/10.1126/science.282.5394.1721</u>

Zeqiraj, E., Filippi, B. M., Deak, M., Alessi, D. R., & van Aalten, D. M. F. (2009). Structure of the LKB1-STRAD-M025 Complex Reveals an Allosteric Mechanism of Kinase Activation. Science, 326(5960), 1707-1711. <u>https://doi.org/10.1126/science.1178377</u>

Zhang, N., Ge, G., Meyer, R., Sethi, S., Basu, D., Pradhan, S., Zhao, Y. J., Li, X. N., Cai, W. W., El-Naggar, A. K., Baladandayuthapani, V., Kittrell, F. S., Rao, P. H., Medina, D., & Pati, D. (2008). Overexpression of Separase induces aneuploidy and mammary tumorigenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(35), 13033–13038. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.0801610105</u>

Zhang, N., Scorsone, K., Ge, G., Kaffes, C. C., Dobrolecki, L. E., Mukherjee, M., Lewis, M. T., Berg, S., Stephan, C. C., & Pati, D. (2014). Identification and Characterization of Separase Inhibitors (Sepins) for Cancer Therapy. Journal of biomolecular screening, 19(6), 878–889. https://doi.org/10.1177/1087057114520972

Zhang, T., Lim, H. H., Cheng, C. S., & Surana, U. (2006). Deficiency of centromere-associated protein Slk19 causes premature nuclear migration and loss of centromeric elasticity. Journal of Cell Science, 119(3), Article 3. <u>https://doi.org/10.1242/jcs.02757</u>

Zheng, B., & Cantley, L. C. (2007). Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(3), 819–822. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.0610157104</u>

Zimmermann, C., Garcia, I., Omerzu, M., Chymkowitch, P., Zhang, B., & Enserink, J. M.





(2017). Mapping the Synthetic Dosage Lethality Network of CDK1/CDC28. G3 (Bethesda, Md.), 7(6), 1753–1766. <u>https://doi.org/10.1534/g3.117.042317</u>

Zou, H., McGarry, T. J., Bernal, T., & Kirschner, M. W. (1999). Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. Science (New York, N.Y.), 285(5426), Article 5426. <u>https://doi.org/10.1126/</u> <u>science.285.5426.418</u>

Zubiete-Franco, I., García-Rodríguez, J. L., Lopitz-Otsoa, F., Serrano-Macia, M., Simon, J., Fernández-Tussy, P., Barbier-Torres, L., Fernández-Ramos, D., Gutiérrez-de-Juan, V., López De Davalillo, S., Carlevaris, O., Beguiristain Gómez, A., Villa, E., Calvisi, D., Martín, C., Berra, E., Aspichueta, P., Beraza, N., Varela-Rey, M., ... Martínez-Chantar, M. L. (2019). SUMOylation regulates LKB1 localization and its oncogenic activity in liver cancer. EBioMedicine, 40, 406-421. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.031

