



Tesis Doctoral

**Importancia de la fase G1 del ciclo
celular en medios pobres en nitrógeno
en *Schizosaccharomyces pombe***

Ángela Rubio Tenor

Universidad de Salamanca-CSIC
Instituto de Biología Funcional y Genómica

2017



Tesis Doctoral

**Importancia de la fase G1 del ciclo celular en
medios pobres en nitrógeno en
*Schizosaccharomyces pombe***

Ángela Rubio Tenor

Instituto de Biología Funcional y Genómica
CSIC-Universidad de Salamanca

2017



**Universidad de Salamanca-CSIC
Instituto de Biología Funcional y Genómica**

El **Dr. D. Sergio Moreno Pérez**, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Importancia de la fase G1 del ciclo celular en medios pobres en nitrógeno en *Schizosaccharomyces pombe*” presentada por la licenciada D^a. Ángela Rubio Tenor para optar al grado de Doctora en Biotecnología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Centro Mixto de Biología Funcional y Genómica, CSIC-Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firma el siguiente certificado en Salamanca,

a 16 de Mayo de 2017

Fdo. Sergio Moreno Pérez



**Universidad de Salamanca-CSIC
Instituto de Biología Funcional y Genómica**

El **Dr. D. Francisco del Rey Iglesias**, Catedrático del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Importancia de la fase G1 del ciclo celular en medios pobres en nitrógeno en *Schizosaccharomyces pombe*” presentada por la licenciada D^a. Ángela Rubio Tenor para optar al grado de Doctora en Biotecnología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. Sergio Moreno Pérez en el Centro Mixto de Biología Funcional y Genómica, CSIC-Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firma el siguiente certificado en Salamanca,

a 16 de Mayo de 2017

Fdo. Francisco del Rey Iglesias

A mi familia

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	5
Introducción	9
1. El ciclo celular	9
2. El ciclo de vida de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	10
3. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> como organismo modelo	12
4. Regulación del ciclo celular en <i>S. pombe</i>	13
5. Reguladores negativos de G1	15
5.1. Rum1	15
5.2. Ste9	16
6. La transición G2/M	19
7. Regulación de la transición G2/M	19
8. Inicio de la fase S	21
9. CDK inhibe la re-replicación	24
10. El <i>checkpoint</i> de daño en el DNA	25
11. El complejo MBF	28
11.1. Expresión de genes regulados por MBF	30
11.2 Regulación de MBF por la actividad CDK	31
11.3 Regulación de MBF por los <i>checkpoints</i> de replicación y de daño	33
11.4. Regulación de MBF por TORC2	35
12. E2F en mamíferos	35
Objetivos	37
Resultados	39
1. La proteína Rum1 se acumula y Ste9 se desfosforila en MMF	40
2. Rum1 y Ste9 son necesarios para la extensión de la fase G1 en MMF	42
3. El doble mutante <i>rum1Δ</i> y <i>ste9Δ</i> entra prematuramente en fase S	43
4. El doble mutante <i>rum1Δ ste9Δ</i> presenta células alargadas bloqueadas en G2 y más células en fase S que la cepa silvestre	44
5. El mutante <i>rum1Δ</i> y <i>ste9Δ</i> acumula daño endógeno en el DNA en MMF	48

6. El papel de los <i>checkpoints</i> de integridad del DNA en la supervivencia del mutante <i>rum1Δ ste9Δ</i> en MMF	52
6.1 La viabilidad del mutante <i>rum1Δ ste9Δ</i> en MMF depende de la quinasa Rad3	52
6.2 La elongación de las células del mutante <i>rum1Δ ste9Δ</i> en MMF depende de la quinasa Chk1 que se activa a tiempos cortos	54
7. El efecto del cambio de la distribución de las fases del ciclo en el mutante <i>rum1Δ ste9Δ</i> en MMF	57
7.1. Reducción de la actividad CDK en el mutante <i>rum1Δ ste9Δ</i> en MMF	57
7.2. Incremento y reducción de la actividad PP2A en el mutante <i>rum1Δ ste9Δ</i> en MMF	60
7.3. La delección de <i>igo1⁺</i> rescata el estrés replicativo que presentan las células del mutante <i>rum1Δ ste9Δ</i> en medios ricos	63
7.4. La delección de <i>cig2⁺</i> empeora el fenotipo del mutante <i>rum1Δ ste9Δ</i> en MMF	64
8. La delección de <i>spd1⁺</i> alivia el fenotipo del mutante <i>rum1Δ ste9Δ</i> en MMF	67
9. La transcripción dependiente de MBF es más baja en el mutante <i>rum1Δ ste9Δ</i>	69
10. Baja actividad transcripcional dependiente de MBF en medio pobre causa inestabilidad genómica	73
11. La delección de <i>nrm1⁺</i> alivia el fenotipo del mutante <i>rum1Δ ste9Δ</i> en MMF	75
Discusión	79
1. Rum1 y Ste9 son necesarios para la extensión de la fase G1 en medios pobres en nitrógeno	79
2. Rum1 y Ste9 evitan que se genere inestabilidad genómica en MMF	82
3. Activación de los <i>checkpoints</i> de integridad del DNA	84
4. Un aumento de la fase G2 alivia el fenotipo de inestabilidad genómica del mutante <i>rum1Δ ste9Δ</i> en MMF	85
5. La delección de <i>spd1⁺</i> reduce el daño en ausencia de Rum1 y Ste9 en MMF	87
6. La actividad de MBF está desregulada en el mutante <i>rum1Δ</i> y <i>ste9Δ</i>	88
7. Una baja actividad de MBF causa inestabilidad genómica en medios pobres en nitrógeno	89

Conclusiones	93
Materiales y métodos	95
1. Microorganismos y medios de cultivo	95
1.1 Microorganismos	95
1.2 Cultivos de <i>S. pombe</i>	97
1.3 Cultivos de <i>E. coli</i>	98
2. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos	98
2.1 Extracción de plásmidos de DNA en <i>E. coli</i>	98
2.2 Digestión de DNA con enzimas de restricción	98
2.3 Electroforesis de DNA/RNA	99
2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	99
2.5 Extracción de RNA	99
2.6 PCR cuantitativa	99
3. Técnicas de transformación	100
3.1 Transformación de <i>S. pombe</i>	100
3.2. Transformación de <i>E. coli</i>	101
4. Deleción de genes en <i>S. pombe</i>	101
5. Cruces genéticos	103
6. Ensayos de viabilidad en placa	103
7. Inmunodetección de proteínas por <i>western blot</i>	103
7.1 Preparación de extractos proteicos en condiciones desnaturalizantes de células de <i>S. pombe</i>	103
7.2 Medida de la concentración de proteína en los extractos	104
7.3 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE	104
7.4 Análisis por <i>western blot</i> en membranas de PVDF	104
7.5 Electroforesis y <i>western blot</i> de geles <i>Phos-tag</i>	105
7.6 Anticuerpos utilizados	106
8. Microscopía de contraste interferencial (DIC) y fluorescencia	106
8.1 Microscopía de campo claro	106
8.2 Tinción de núcleos y septos con DAPI-Blankophor	106
8.3 Medición del tamaño celular <i>in vivo</i> mediante tinción con Blankophor	106

8.4 Visualización de las proteínas etiquetadas con epítomos fluorescentes Rad52-YFP y Tos4-GFP	107
9. Inmunofluorescencia para la detección de incorporación de BrdU	107
10. Citometría de flujo de células de <i>S. pombe</i>	108
11. Tratamiento informático y estadístico de los datos	108
11.1 Análisis de secuencias	108
11.2 Presentación de los datos y análisis estadístico	108
Bibliografía	111
Agradecimientos	127

Abreviaturas

APC/C: *Anaphase Promoting Complex/ Cyclosome*, complejo promotor de la anafase/ciclosoma.

ATM: *Ataxia Telangiectasia Mutated*

ATP: Adenosín trifosfato

ATR: *ATM and Rad3 Related*

ATRIP: *ART Interacting Protein*

BrdU: Bromodesoxiuridina

BSA: Albúmina sérica bovina

CAPS: 3-N-ciclohexil amino-1-propanosulfonato

CAK: *CDK Activating Kinase*, quinasa activadora de CDK.

CDK: *Cyclin Dependent Kinase*, quinasa dependiente de ciclina

ChIP: *Chromatin Immunoprecipitation*

CKI: *CDK Inhibitor*, inhibidor de CDK

CLS: *Chronological Life Span*

CMG: Complejo Cdc45/ Mcm2-7/ GINS

CRL4: *Cullin Ring E3 Ligase 4*, E3 ubiquitina ligasa de anillo de culina 4

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol

DEPC: agua tratada con dietilpirocarbonato

DDK: *Dbf4-dependent kinase*

dHJ: *Double Holliday Junction*, doble intermediario de Holliday

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: 2'-desoxirribonucleótido-5'-trifosfato

DO: Densidad óptica

DSB: *Double Strand Break*, rotura de doble cadena

DTT: Ditiotreitól

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FBS: Suero bovino fetal

GFP: *Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente

GINS: *Go, Ichi, Ni, San*, del japonés cinco, uno, dos, tres.

HU: Hidroxiurea

Kb: Kilobase

M: Molar

MAP: *Mitogen-activated protein*

MBF: *Mlu1 Binding Factor*

MCM: *Minichromosome maintenance*

MEA: *Malt extract agar*

MMF: Medio mínimo con fenilalanina

MMGlu: Medio mínimo con glutamato

MMNH₄Cl: Medio mínimo con cloruro amónico

MM-N: Medio mínimo sin nitrógeno

MMS: Metilmetanosulfonato

NETO: *New End Take Off*

ORC: *Origin Recognition Complex*, complejo de reconocimiento de orígenes

PBS: *Phosphate buffered saline*

PEG: Polietilenglicol

PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa.

Pre-RC: *pre-Replicative Complex*, complejo pre-replicativo

Rb: Proteína del retinoblastoma

RFC: *Replication Factor C*, factor de replicación C

RNA: Ácido ribonucleico

RNR: Ribonucleótido reductasa

RPA: *Replication protein A*, proteína de replicación A

SB: Sample buffer

SCF: *Skp1-Cullin 1-F box*

SDS: *Sodium dodecyl sulfate*

SPB: *Spindle Pole Body*, cuerpo polar del huso

SRP: *Stress Response Pathway*, ruta de respuesta a estrés

ssDNA: *Single strand DNA*, DNA de cadena sencilla

TAE: Buffer Tris-acetato-EDTA

TBS: *Tris Buffered Saline*

TCA: Ácido tricloroacético

TE: Buffer Tris-EDTA

TEMED: Tetrametiletilendiamina

Tdt: Proteína roja fluorescente *Tandem dimer Tomato*

TORC1/ TORC2: *Target of Rapamycin Complex 1or 2*

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

UV: Ultravioleta

V: Voltio

YES: Extracto de levadura con suplementos

YFP: *Yellow Fluorescent Protein*, proteína amarilla fluorescente

Summary

In fission yeast, the cell size at division depends on the growth conditions (Fantes and Nurse, 1977). Cells growing in nitrogen-rich media divide with a large cell size. On the contrary, cells growing in nitrogen-poor media divide with a small cell size. Recently, our group has described that the Greatwall-Endosulfine pathway (Ppk18-lgo1) couples cell growth and the nutritional environment to the cell cycle machinery by modulating the activity of PP2A/B55 protein phosphatase, that counteracts Cdk1/cyclinB substrate phosphorylation at the onset of mitosis (Chica *et al.*, 2016). In nitrogen-rich medium, fully active TORC1 inhibits Greatwall leading to high PP2A/B55 activity. As a consequence, cells spend a long time in G2 before they initiate mitosis. In nitrogen poor media, TORC1 activity is reduced leading to the activation of Greatwall and phosphorylation of its main target Endosulfine. Phosphorylated Endosulfine is a potent and specific inhibitor of PP2A/B55. Low activity of PP2A/B55 allows entry into mitosis with reduced Cdk/CyclinB activity and a small cell size. After division, these cells delay the cell cycle in G1 because the newly born cells are too small to initiate S-phase, as a consequence a population of cells with 1C peak is detected by flow cytometry (Carlson *et al.*, 1999).

The timing and orderly progression through the different cell cycle events are regulated by cyclin-dependent kinase (CDK) activity oscillations (Coudreuse and Nurse, 2010). Rum1 and Ste9 are both G1 negative regulators, which maintain a low CDK activity during G1 until entry into S-phase. Rum1 is a CDK inhibitor (CKI) of Cdc2-Cig2 and Cdc2-Cdc13 complexes (Moreno and Nurse, 1994; Correa-Bordes *et al.*, 1997; Benito *et al.*, 1998), whereas Ste9 is an activator of Anaphase Promoting Complex (APC) that promotes the degradation of Cig1, Cig2 and Cdc13 cyclins in G1 (Kitamura *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 2000; Yamano, 2000, 2004). Rum1 and Ste9 have been described as necessary for G1 arrest in minimal medium without nitrogen and for mating (Moreno and Nurse, 1994; Stern and Nurse, 1998; Kominami *et al.*, 1998). The double mutant *rum1* Δ *ste9* Δ does not show mitotic defects although it shows higher Cdc13 levels than wild-type cells (Blanco *et al.*, 2000). Thus, both *rum1*⁺ and *ste9*⁺ single deletion mutants do not show any phenotypes in rich media apart

from being sterile and unable to arrest in G1 in minimal medium without nitrogen (MM-N).

In this work, we have characterized the phenotype of the double mutant *rum1Δ ste9Δ* in poor nitrogen medium, where the cells grow with a reduced cell size and they have to extend the G1-phase before they undergo S-phase. We also show that Rum1 and Ste9 are required to prevent genomic instability in MMPhe, where they are up regulated. In rich media, there is no apparent defect of *rum1⁺* and *ste9⁺* deletions, although the double mutant shows HU sensitivity. However, when the mutant cells are grown in nitrogen poor medium, they show a slow S-phase, high levels of DNA damage and cell cycle delay in G2 promoted by the activation of the DNA damage checkpoint. This phenotype is rescued by extending the G2-phase or by reducing the CDK activity.

It has been previously described that Sic1, the budding yeast orthologue of Rum1, promotes origin licensing G1 by inhibiting CDK activity and that *sic1Δ* cells accumulate double strand breaks (DSB) and genomic instability (Lengronne and Schwob, 2002). Also Cdh1, the budding yeast Ste9 orthologue, together with Sic1 are required to prevent chromosome instability by promoting efficient origin firing (Ayuda-Duran *et al.*, 2014). Moreover, in mouse primary MEFs, acute depletion or permanent ablation of Cdh1 caused genomic instability by slowing down DNA replication fork movement and increased origin activity. Partial inhibition of origin firing did not accelerate replication forks, suggesting that fork progression is intrinsically limited in the absence of Cdh1 (García-Higuera *et al.*, 2008; Garzón *et al.*, in press). Since budding yeast and mammalian cells have a long G1 phase, it makes sense that the fission yeast *rum1Δ ste9Δ* cells only shows endogenous DNA damage in poor-nitrogen medium, where the G1-phase is extended.

To promote the G1/S transition, the CDK activates the Mlul cell cycle box-binding factor (MBF) complex (Reymond *et al.*, 1993; Banyai *et al.*, 2016), the fission yeast functional orthologue of mammalian E2F, that activates the expression of genes involved in the initiation of DNA replication, nucleotide biogenesis and the regulation of S-phase (Bahler, 2005). The MBF complex is bound to its target promoters throughout the cell cycle and it is tightly regulated by positive and negative regulators that restrict MBF activation to the G1/S transition (Wuarin *et al.*, 2002). Rep2 is a MBF transcriptional activator, whereas Nrm1 and Yox1 are repressors of MBF during S-phase and G2 (Baum *et al.*, 1997; Nakashima *et al.*, 1995; De Bruin *et al.*, 2006; Aligianni *et al.*, 2009). In S-phase, MBF could be activated during replication stress by down-regulation of Nrm1 (de Bruin *et al.*, 2008) and Yox1 after phosphorylation by Cds1 (Ivanova *et al.*, 2011, Aligianni *et al.*, 2009, Purtill *et al.*, 2011). By contrast, when the DNA damage checkpoint is active, Chk1 phosphorylates Cdc10, one of the subunits of MBF, and promotes its release from some target promoters repressing MBF-dependent transcription (Ivanova *et al.*, 2013).

Our data suggest that MBF-dependent transcription is impaired in the *rum1Δ ste9Δ* mutant both in nitrogen-rich and in nitrogen-poor medium. Although it has been described that mutants with higher MBF activity (*yox1Δ* or *nrm1Δ*) present genomic

instability under normal laboratory conditions (nitrogen-rich media) (Gómez-Escoda *et al.*, 2011; Caetano *et al.*, 2014), we have shown that an up-regulation of MBF in MMPhe is less detrimental in nitrogen-poor medium. In fact, reduced MBF activity in *rep2Δ* cells growing in MMPhe generated higher levels of DNA damage. Our results indicate that a proper pulse of MBF activity at the end of G1 is particularly critical in MMPhe.

A reduced dNTP pool may play a role in the genomic instability of the *rum1Δ ste9Δ* mutant in MMPhe. This could be caused by a defective degradation of Spd1, which prevents the assembly of an active RNR (Liu *et al.*, 2003; Hakansson *et al.*, 2005). Spd1 is normally targeted for degradation by the CRL4^{Cdt2} ubiquitin ligase at the onset of S-phase. Cdt2 is one of the targets of the MBF transcription factor (Liu *et al.*, 2003, 2005; Holmberg *et al.*, 2005; Hofmann and Beach, 1994). Thus, a defective MBF activation could be responsible for the reduced expression of RNR and high levels of Spd1. Consistent with this hypothesis deletion of *spd1⁺* partially rescued the *rum1Δ ste9Δ* phenotype. Deletion of *nrm1⁺* also rescued the DNA damage phenotype of the double mutant *rum1Δ ste9Δ*. However, this effect could be caused not only by an increase in the MBF activity, but also by an extension of G2, as it happens in nitrogen rich medium.

In sum, we found that Rum1 and Ste9 are up regulated in nitrogen poor medium MMPhe. These activities are required to promote a delay in G1/S and to regulate MBF activity. In MMPhe, a delay in the MBF-dependent transcription is necessary to generate enough levels of transcripts required for S-phase.

Introducción

1. El ciclo celular

La división celular es un proceso fundamental para que cualquier ser vivo se multiplique. Durante el ciclo celular mitótico, los cromosomas deben duplicarse y segregarse para dar lugar a células hijas con la misma cantidad de cromosomas que la célula progenitora.

El ciclo celular mitótico se divide en cuatro fases: G1, S, G2 y M. Las tres primeras se suelen agrupar en lo que se define como interfase. Los eventos fundamentales que intervienen en la división celular se producen en momentos bien definidos. La síntesis del DNA ocurre durante la fase S (del inglés, *Synthesis*) del ciclo celular y tiene como consecuencia la duplicación del material genético. La segregación de los cromosomas se produce durante la mitosis o fase M. Para la separación de las cromátidas hermanas se forma el huso mitótico compuesto por microtúbulos que emergen de los centrosomas en células animales o de los SPBs (del inglés *Spindle Pole Body*) en levaduras y otros hongos. Éstos se ubican en los polos de la célula y tiran de los microtúbulos unidos a las cromátidas hermanas a través de los cinetocoros. Una vez desaparece la cohesión entre las cromátidas hermanas, se produce su separación.

La mitosis, durante la cual se produce la división del núcleo y del citoplasma, es un proceso continuo que convencionalmente se divide en varias etapas: profase, metafase, anafase y telofase. Durante la profase, los cromosomas se condensan y la envuelta nuclear se desensambla. En la metafase, los cromosomas se alinean en medio de la célula formando la placa metafásica y también se ensambla el huso mitótico. Cuando la célula entra en anafase, las cromátidas hermanas se separan y se mueven hacia lados opuestos de la célula. En la telofase, se vuelve a formar la envuelta nuclear y la división celular se completa cuando se separa el citoplasma de las dos células hijas en la citoquinesis. A diferencia de las células de eucariotas superiores, en las levaduras y otros hongos, la envuelta nuclear no se disgrega y la mitosis es cerrada.

Las fases G1 y G2 (del inglés, *Gap*) son etapas de espaciado. Su finalidad es que las células tengan tiempo de prepararse para la siguiente fase y que la célula verifique que la etapa anterior se realizó adecuadamente. En caso de que se detecte algún problema se activan mecanismos de control o *checkpoints*, cuyo objetivo es detener la progresión por el ciclo celular y dar tiempo para que la lesión sea reparada. Se han descrito *checkpoints* al final de la fase G1, en la transición G2/M y en la transición metafase-anafase dentro de la mitosis. Al final de la fase G1, el punto de control se llama *Start* (del inglés, inicio), y las células coordinan el crecimiento y tamaño celular con la disponibilidad de nutrientes. El punto de control de G2 impide la entrada en mitosis en caso de que la replicación del DNA no se haya completado o esté dañado, la célula no tenga el tamaño suficiente o las condiciones del medio no sean favorables. Finalmente, en la metafase se retrasa la transición a la anafase y la segregación de los cromosomas hasta que todos éstos estén alineados y todas las cromátidas hermanas estén unidas a microtúbulos (Hartwell y Weinert, 1989; Nurse, 1997).

El ciclo celular meiótico tiene como objetivo producir células con la mitad de cromosomas que la célula progenitora. Las células que hacen este ciclo deben ser diploides. En el ciclo celular meiótico, tras la fase S meiótica, se produce un proceso de recombinación homóloga entre pares de cromátidas hermanas. A continuación, y a diferencia del ciclo mitótico, se producen dos rondas de segregación cromosómica, conocidas como meiosis I y meiosis II para separar en la primera de ellas los cromosomas homólogos y en la segunda, las cromátidas hermanas. Finalmente, se forman cuatro células haploides (revisado en Watson *et al.*, 2008)

En la mayoría de organismos, las distintas fases del ciclo celular están asociadas al crecimiento celular y, aunque la masa celular se duplica, esto apenas repercute en el tamaño de las células, que prácticamente no varía.

2. El ciclo de vida de *Schizosaccharomyces pombe*

La levadura *Schizosaccharomyces pombe*, también conocida como levadura de fisión, presenta células de forma cilíndrica. El crecimiento se produce por los polos de la célula manteniendo su diámetro constante. En condiciones de crecimiento estándar de laboratorio (medio rico), esta levadura mide unas 3,5 μm de diámetro y entre 8-14 μm de longitud. Cuando las células alcanzan el tamaño necesario para dividirse se separan mediante la formación de un septo transversal que se disuelve tras la citoquinesis (Fantes, 1977). Las células de *S. pombe* son generalmente haploides en la naturaleza, tienen un genoma de 12 Mb, tamaño similar al de la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, y está organizado en tres cromosomas.

Su ciclo celular se caracteriza por tener una fase G1 muy corta y una fase G2 muy larga cuando se crece en medios ricos en el laboratorio (Nurse, 1975) (**Figura 1A**). En estas condiciones, la fase S se inicia antes de que las células hayan septado. De esta manera, a pesar de ser un organismo haploide, mantiene dos copias de su material genético la mayor parte del ciclo.

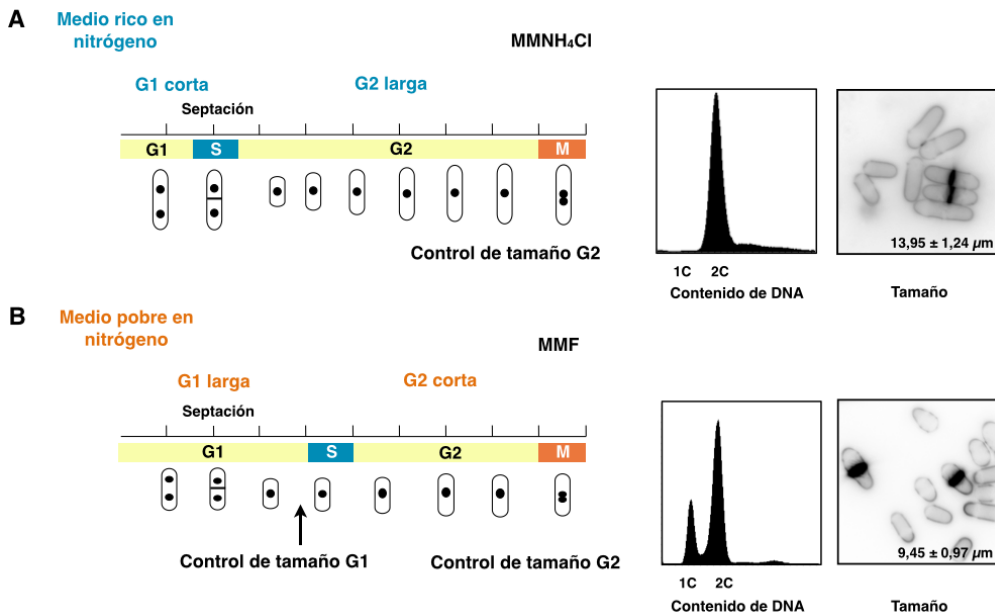


Figura 1. Esquema de la distribución de las fases del ciclo celular según la fuente de nitrógeno del medio. **A.** En medio mínimo con cloruro amónico como fuente de nitrógeno (MMNH₄Cl), las células son largas y sólo se aprecia un pico 2C de contenido de DNA por citometría de flujo debido a que la fase S comienza antes de que se produzca la septación. **B.** En medio mínimo con fenilalanina (MMF), es posible detectar un pico 1C correspondiente a la extensión de la fase G1 y a que la septación ocurre antes de que las células inicien la fase S. En este medio, cobra importancia el control de tamaño en G1.

El tamaño necesario para la división viene determinado por las condiciones de crecimiento (Fantès y Nurse, 1977). La levadura de fisión tiene dos controles de tamaño: al final de G1 y al final de G2. En medio rico en nitrógeno, la célula crece principalmente durante la fase G2 hasta alcanzar el tamaño necesario para la división celular (**Figura 1A**). En estas condiciones el tamaño de las células hijas supera el umbral mínimo requerido para la entrada en la fase S. Por tanto, el control de tamaño en G1 es crítico y las células entran rápidamente en fase S. Sin embargo, en medios pobres en nitrógeno, las células reducen la fase G2, aceleran la entrada en mitosis, y reducen el tamaño celular (**Figura 1B**). Como consecuencia, cobra importancia el control de tamaño en G1 ya que las células extienden la fase G1 para crecer hasta alcanzar el tamaño necesario para iniciar la fase S (Nurse, 1975; Nurse y Thuriaux, 1977; Nasmyth *et al.*, 1979; Sveiczzer *et al.*, 1996).

En *S. pombe*, cuando el nitrógeno se agota totalmente, las células se bloquean en la fase G1, mientras que si se agota la fuente de carbono, las células se bloquean en la fase G2 (Costello *et al.*, 1986). Si los nutrientes son limitantes, especialmente el nitrógeno, y hay células de tipo sexual opuesto h⁺ y h⁻, éstas pueden iniciar la conjugación. En este proceso, las dos células se fusionan para dar lugar a un cigoto diploide. Si las condiciones nutricionales siguen siendo pobres tras la conjugación, continúan un ciclo meiótico que dará lugar a cuatro esporas haploides. Estas esporas

mantendrán su estado quiescente hasta que las condiciones sean propicias para germinar y entrar de nuevo en el ciclo mitótico. No obstante, si los cigotos se cambian a un medio rico antes de hacer meiosis, pueden proliferar como diploides con ciclos mitóticos. Al final de este crecimiento vegetativo, estas células diploides pueden entrar directamente en meiosis y formar esporas, lo que se conoce como esporulación acigótica (**Figura 2**) (Yamamoto, 1996).

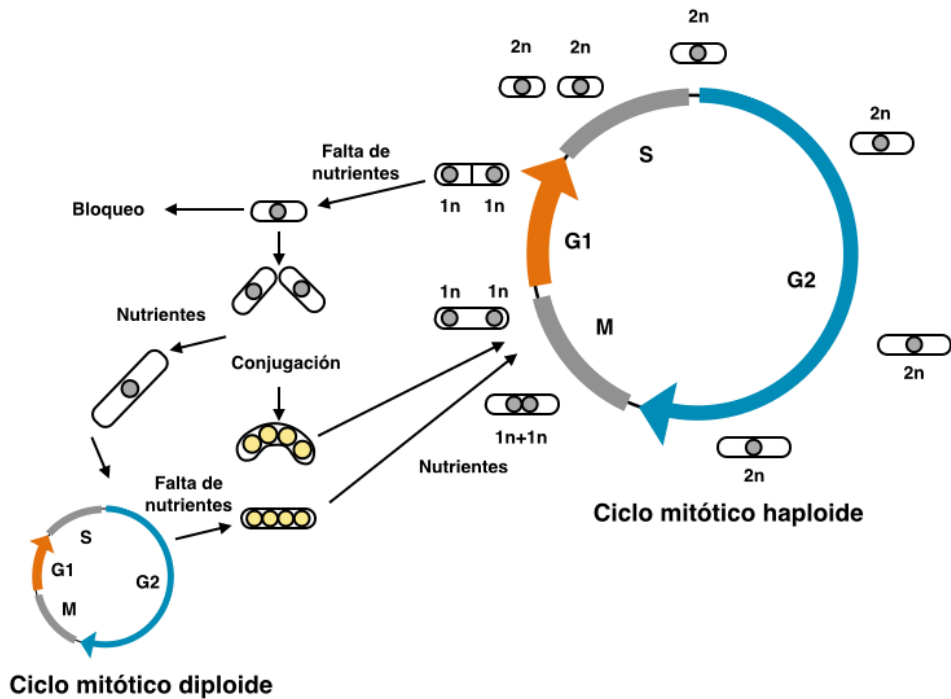


Figura 2. Esquema del ciclo celular y del ciclo de vida de *S. pombe*. Cuando los nutrientes se agotan, las células de tipo sexual opuesto conjugan y forman un cigoto diploide que entra en meiosis y esporula. Si el cigoto diploide detecta condiciones favorables en el medio, entra en ciclo mitótico. Si las condiciones nutricionales son desfavorables de nuevo, el diploide entra a meiosis y esporula.

3. *Schizosaccharomyces pombe* como organismo modelo

La levadura de fisión *S. pombe* junto con la levadura de gemación *S. cerevisiae*, son muy utilizadas como organismos modelos en los laboratorios por tener procesos biológicos fundamentales conservados similares a los eucariotas superiores. Sin embargo, a pesar de que las dos son levaduras, se separaron de su ancestro común hace más de 400 millones de años; son tan diferentes entre sí como de los animales. Esta divergencia evolutiva se refleja tanto en sus ciclos de vida como en la regulación de su ciclo celular (Sipiczki, 2000).

S. cerevisiae se divide por gemación, generalmente es diploide y tiene una fase G1 larga. Por este motivo, el principal punto de regulación en su ciclo celular tiene lugar en la transición G1/S. Sin embargo, *S. pombe* se divide por fisión, normalmente es

haploide y la mayor parte de su ciclo celular lo ocupa la fase G2. Por tanto, su principal punto de control está en la transición G2/M.

Algunas de las ventajas que presenta la levadura de fisión con respecto a *S. cerevisiae* son que posee intrones, la regulación de la expresión génica se produce por una maquinaria similar al RNA interferente, la estructura de los orígenes de replicación o de los centrómeros son similares a las de los eucariotas superiores y la regulación del ciclo celular en G2/M está muy conservada. Por este motivo, se ha utilizado la levadura de fisión en el estudio de la dinámica de los cromosomas y en la regulación del ciclo celular (Moser y Russell, 2000).

Como levadura, *S. pombe* presenta numerosas ventajas para el estudio de la biología celular y molecular de los organismos eucariotas. Se trata de un organismo fácilmente manipulable genéticamente, permite el estudio del fenotipo de mutaciones recesivas por ser haploide, el tiempo de generación es muy corto, se pueden hacer estudios de interacciones genéticas a gran escala y todo ello a un menor coste que en eucariotas superiores (revisado en Forsburg y Nurse, 1991; Forsburg, 2005)

4. Regulación del ciclo celular en *S. pombe*

La progresión del ciclo celular en los eucariotas está regulada por los complejos CDKs (del inglés, *Cyclin Dependent Kinases*) -ciclina. Las ciclina reconocen un motivo PSTAIRE, propio de las CDKs para unirse e inducen un cambio conformacional que las activa (Jeffrey, 1995). Las ciclina fueron identificadas como proteínas que oscilaban a lo largo del ciclo celular mediante su síntesis y degradación (Evans *et al.*, 1983). Las CDKs son proteínas quinasas que fosforilan a sus sustratos en residuos de serina y treonina seguidos de prolina.

Los diferentes complejos CDK-ciclina presentan distintas afinidades por los sustratos, lo cual es necesario para realizar las diferentes transiciones del ciclo celular. Por tanto, la actividad CDK se puede regular mediante el control de la expresión y de la localización subcelular de estas proteínas. Además, la actividad CDK también se encuentra regulada por inhibidores y por cambios en la fosforilación de la subunidad catalítica en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, al tamaño celular o a la activación de los *checkpoints* (Morgan, 1997) (**Figura 3**). Algunos de estos mecanismos se retroalimentan mediante *feedback loops* que permiten generar cambios abruptos en la actividad CDK, lo que contribuye a la progresión ordenada en una dirección de las fases del ciclo (Novak *et al.*, 2007)

En *S. pombe* el ciclo celular es regulado por tan sólo una CDK, Cdc2, necesaria tanto para la transición G1/S como para la transición G2/M y cuyos niveles no varían durante el ciclo celular (Simanis y Nurse, 1986). Cdc2 es capaz de unirse a cuatro ciclina en la levadura de fisión: Cig1, Cig2, Puc1 y Cdc13, cuyos niveles oscilan durante el ciclo celular (Fisher y Nurse, 1995; Martín-Castellanos *et al.*, 1996; Martín-Castellanos *et al.*, 2000). Por tanto, la actividad de Cdc2 específica de cada momento del ciclo celular depende de las ciclina a las que se encuentre asociadas.

Cig2 es la principal ciclina que dirige la transición G1/S. Tanto su expresión como los niveles de proteína se incrementan al final de la fase G1 y disminuyen tras la fase S. Las células que carecen de *cig2*⁺ muestran, por tanto, un retraso en la transición G1/S y son hiperfértilas (Connolly y Beach, 1994; Obara-Ishihara y Okayama, 1994; Martín-Castellanos *et al.*, 1996).

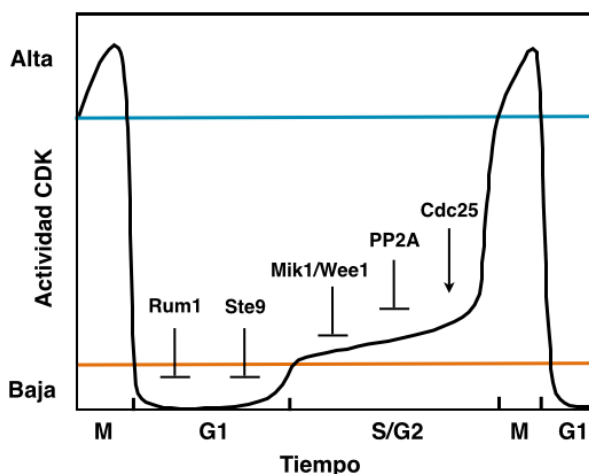


Figura 3. Modelo cuantitativo de la actividad CDK y algunos reguladores positivos y negativos en *S. pombe*. (Adaptado de Coudreuse y Nurse, 2010).

Por otro lado, Cdc13 es necesario para la actividad de Cdc2 en el inicio de la mitosis. Aunque los niveles de RNA mensajero (mRNA) de *cdc13*⁺ son constantes, los niveles de Cdc13 son bajos durante la fase G1, aumentan durante la fase G2 y la mitosis y, finalmente, se reducen drásticamente en anafase, donde la ciclina se degrada (Hagan *et al.*, 1988; Bueno y Russell, 1993).

Las otras dos ciclinas, Cig1 y Puc1, controlan la progresión por la fase G1. Cig1 es capaz de suplir la falta de función de Cig2 y aunque los niveles de expresión son constantes durante el ciclo celular, los niveles de proteína varían de forma similar a los de Cdc13 (Bueno *et al.*, 1991). Por otro lado, los niveles de Puc1 son constantes durante todo el ciclo y en ausencia de Cig1 y Cig2, impide que se retrase la fase G1 (Martín-Castellanos *et al.*, 2000).

Fase	<i>S. pombe</i>		<i>S. cerevisiae</i>		Vertebrados	
	Ciclina	CDK	Ciclina	CDK	Ciclina	CDK
G1	Puc1, Cig1	Cdc2	Cln3	Cdc28	Ciclina D	Cdk4, 6
G1/S	Cig2, Cdc13	Cdc2	Cln1, 2	Cdc28	Ciclina E	Cdk2
S	Cig2, Cdc13	Cdc2	Clb5,6	Cdc28	Ciclina A	Cdk2
M	Cdc13	Cdc2	Clb 1,2,3,4	Cdc28	Ciclina B	Cdk1

Tabla 1. Principales complejos CDK-ciclina en vertebrados, *S. cerevisiae* y *S. pombe*. Revisado en Malumbres, 2014 y Uhlmann *et al.*, 2011.

Además, en *S. pombe* se ha demostrado que el complejo Cdc2-Cdc13 es el único necesario para dirigir las fases del ciclo celular en este organismo. De forma general, la actividad CDK total se mantiene baja durante la fase G1, se incrementa paulatinamente tras el paso por *Start*, alcanza el máximo nivel en mitosis y cae de forma abrupta en la anafase. Por tanto, se ha propuesto un modelo cuantitativo en el que los niveles bajos de actividad CDK regulan el paso por *Start* y el inicio de la fase S, mientras que niveles altos promueven la entrada en mitosis para asegurar la alternancia entre las fases S y M (Fisher y Nurse, 1996; Stern y Nurse, 1996; Coudreuse y Nurse, 2010).

5. Reguladores negativos de G1

Durante la fase G1, la actividad CDK se mantiene baja principalmente gracias a la acción de dos mecanismos: la degradación de la ciclina Cdc13 mediada por el proteasoma y la inhibición de Cdc2 por Rum1.

5.1. Rum1

Rum1 es un CKI (del inglés, *CDK Inhibitor*) con función similar a Sic1 de *S. cerevisiae* y a p27 de mamíferos (Sánchez-Díaz *et al.*, 1998; Barberis *et al.*, 2005). Este inhibidor regula negativamente los complejos Cdc2-Cdc13 y Cdc2-Cig2 durante la fase G1 y promueve la degradación de Cdc13 (**Figura 4**). Por tanto, Rum1 permite alcanzar el tamaño celular necesario antes de pasar *Start* e iniciar la fase S (Moreno y Nurse, 1994; Martin-Castellanos *et al.*, 1996; Correa-Bordes *et al.*, 1997; Benito *et al.*, 1998).

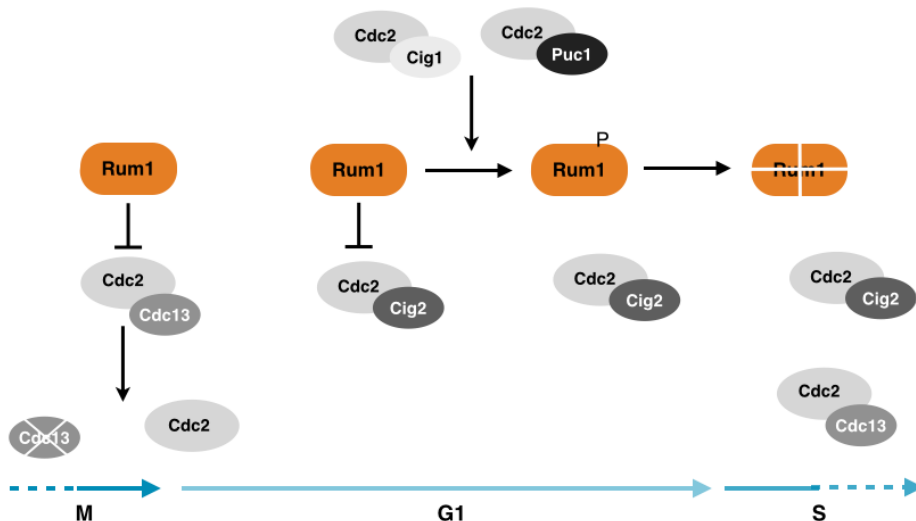


Figura 4. Regulación de Rum1 durante la fase G1 (adaptado de Mosser y Russell, 2000). Los complejos Cdc2-Cig1 y Cdc2-Puc1 promueven la degradación de Rum1, lo que a su vez favorece la acumulación de actividad CDK y la entrada en fase S.

En células donde se induce la sobreexpresión de *rum1⁺*, se bloquea el inicio de la mitosis como consecuencia de la inactivación total de Cdc13 y se produce el inicio de varias rondas de replicación del DNA en ausencia de mitosis (Moreno y Nurse, 1994). De igual forma, la delección de *cdc13⁺* también presenta este fenotipo de re-replicación (Hayles *et al.*, 1994).

Los niveles de Rum1 se acumulan en anafase y se mantienen altos durante la fase G1. A continuación en la transición G1/S, los complejos Cdc2-Cig1 y Cdc2-Puc1, que son insensibles a la inhibición por Rum1, fosforilan a Rum1 en las treoninas 58 y 62, que son importantes para su degradación por el proteasoma (Benito *et al.*, 1998; Martin-Castellanos *et al.*, 2000). De esta manera, los complejos Cdc2-Cig1 y Cdc2-Puc1 inducen la transición G1/S.

También se sabe que tanto los niveles de los dos transcritos como de la proteína Rum1 aumentan en medio sin nitrógeno cuando las células se bloquean en G1, lo que indica que está regulado según la disponibilidad de nutrientes. Además, elementos del extremo 3' UTR promueven la inestabilidad de los mRNAs (Daga *et al.*, 2003).

Las células que carecen de *rum1⁺* entran de forma prematura en la fase S independientemente de su tamaño. En medio rico en nitrógeno, este defecto no tiene ninguna repercusión, puesto que el tamaño de las células al final de la mitosis es mayor que el tamaño necesario para pasar *Start*. Además, estas células no aceleran la entrada en mitosis y se dividen con el mismo tamaño celular y con el mismo tiempo de generación que la cepa silvestre. Sin embargo, cuando las células necesitan alargar la fase G1 en determinadas condiciones, por ejemplo durante la conjugación, o en mutantes con una fase G2 más corta, la función de Rum1 es muy importante. De esta forma, el mutante *rum1Δ* es estéril y en combinación con *wee1-50* (una mutación en *wee1⁺* que le confiere termosensibilidad) a la temperatura restrictiva, no se produce el alargamiento de la fase G1 propio del mutante de *wee1Δ*. Como resultado, las células de este doble mutante se dividen cada vez a un menor tamaño y en pocas divisiones, mueren (Moreno y Nurse, 1994; Sveiczzer *et al.*, 1996).

Por todo ello, se considera a Rum1 como una proteína fundamental en el punto de control *Start*, puesto que asegura la alternancia de las fases S y M y durante la fase G1 impide la entrada en fase S hasta que las células alcanzan el tamaño adecuado.

5.2. Ste9

Ste9 es un activador del complejo E3 ubiquitin ligasa APC/C (del inglés, **Anaphase Promoting Complex/Cyclosome**). La ubiquitinación y subsiguiente degradación de proteínas por el proteasoma 26S es esencial para llevar a cabo distintos procesos durante la mitosis y en la transición G1/S. Además de APC/C, se han descrito otros dos complejos E3 ubiquitin ligasas que también están implicados en la regulación del ciclo celular y determinan qué sustratos y cuándo son ubiquitinados: el complejo SCF (del inglés, **Skp1-Cullin1-F-box**) y CRL4^{Cdt2} (del inglés **Cullin Ring E3 Ligase 4**).

La función principal de CRL4^{Cdt2} es impedir la re-replicación durante la fase S como se explica en el apartado 9. Por otro lado, las proteínas *F-box* se unen a Skp1,

subunidad del complejo SCF, y permiten el reconocimiento de sustratos específicos. En *S. pombe*, las dos proteínas *F-box* Pop1 y Pop2 son necesarias para la degradación de Rum1 y de Cdc18, proteína implicada en el licenciamiento de orígenes de replicación (Kominami y Toda, 1997; Jallepalli *et al.*, 1998; Kominami *et al.*, 1998).

El complejo APC/C se activa en la transición metafase-anafase y permanece activa durante la fase G1 (Amon *et al.*, 1994; Brandeis y Hunt, 1996). Su especificidad de sustrato se encuentra regulada por dos proteínas activadoras con dominios WD40: Slp1, ortólogo de Cdc20 en *S. cerevisiae* y mamíferos, y Ste9, ortólogo de Cdh1 en *S. cerevisiae* y mamíferos (Yamaguchi *et al.*, 1997; Kitamura *et al.*, 1998). Slp1 actúa principalmente en la transición metafase-anafase y degrada a la securina Cut2, el inhibidor de la separasa que a su vez, degrada a las cohesinas en anafase (Kim *et al.*, 1998; Yanagida, 2000). Estas proteínas reconocen a los sustratos de APC/C a través de señales de destrucción conocidas como motivos *D box* o *KEN box* (Glotzer *et al.*, 1991; Pflieger y Kirschner, 2000).

La función principal de Ste9 es promover la degradación de las ciclinas Cdc13 y Cig1 durante la fase G1 (Blanco *et al.*, 2000). La sobreexpresión de Ste9 promueve la degradación completa de Cdc13 y las células inician varias rondas de replicación en ausencia de mitosis (Yamaguchi *et al.*, 1997; Kitamura *et al.*, 1998).

En el caso de Cig2, se ha propuesto que su degradación está mediada por dos complejos. APC/C se requiere para la destrucción de Cig2 desde la anafase hasta el final de la fase G1 al igual que para Cdc13, y SCF durante la fase G2 y la mitosis. Además, se ha relacionado a SCF con la represión de la transcripción de Cig2 en estas fases (Yamano, 2000; Yamano, 2004).

Ste9 está regulado negativamente mediante fosforilación por Cdc2, lo que promueve su disociación de APC/C y hace que la proteína sea menos estable. Se ha visto que en un bloqueo en G1 usando el mutante termosensible *cdc10-129*, la proteína Ste9 presenta una mayor migración por *western blot*, como consecuencia de una menor fosforilación y mayor actividad (Blanco *et al.*, 2000). Sin embargo, los niveles de la proteína no aumentan sensiblemente. De la misma forma que en células sincronizadas y liberadas en G1, se observa que Ste9 durante la fase G2 presenta un cambio de movilidad correspondiente a una mayor fosforilación y menor actividad. La cantidad de proteína Ste9 se reduce durante la fase G2 aunque no de forma drástica. Este control sobre Ste9 limita su actividad a la fase G1, cuando la actividad CDK es baja (**Figuras 3, 4 y 5**) (Blanco *et al.*, 2000).

Asimismo, se ha descrito que Ste9, al igual que Rum1, presenta un RNA mensajero muy inestable. La eliminación de secuencias ricas en adenosina y uridina en el extremo 3' UTR del mensajero, propia de mensajeros inestables, hacen que se acumule más transcrito y más proteína Ste9 (Álvarez *et al.*, 2006). Por otra parte, la expresión de *ste9⁺* depende del factor de transcripción MBF (Tournier y Millar, 2000).

En otros organismos como *S. cerevisiae* y mamíferos, la inactivación de Ste9/Cdh1 también se produce mediante fosforilación por las CDKs mitóticas, lo que promueve su disociación de APC (Zachariae *et al.*, 1998; Kramer *et al.*, 2000). Además, al

menos en *S. cerevisiae*, se ha descrito que la activación por desfosforilación la lleva a cabo la fosfatasa Cdc14, que deja de estar secuestrada en el nucleolo en anafase para promover la salida de mitosis (Visintin *et al.*, 1998; Jaspersen *et al.*, 1999; Shou *et al.*, 1999). Esta fosfatasa también promueve la acumulación de Sic1, el ortólogo de Rum1 en *S. cerevisiae*, tras la salida de mitosis. Sin embargo, en *S. pombe*, el ortólogo de Cdc14, Flp1, no se requiere ni para la estabilización de Rum1 ni para la desfosforilación de Ste9 (Cueille *et al.*, 2001).

A diferencia de Rum1, la degradación de Ste9 no está mediada por el proteasoma, puesto que por *western blot* se observó que los niveles de Ste9 no aumentan cuando se inactiva el proteasoma en los mutantes termosensibles de algunas de sus subunidades (tesis doctoral de Miguel A. Blanco Rodríguez, 2001). Sin embargo, en mamíferos, APC/Cdh1 regula la degradación de Skp2, proteína *F-box* de SCF, y SCF degrada a Cdh1 (Bashir *et al.*, 2004; Fukushima *et al.*, 2013)

Ste9 junto con Rum1 son los responsables de establecer la duración de la fase G1 mediante la regulación negativa de la actividad CDK (**Figura 5**), por este motivo, las células que carecen de *rum1*⁺ o de *ste9*⁺ son incapaces de conjugarse. Si se cultivan células silvestres de *S. pombe* en medio sin nitrógeno, éstas se dividen dos veces y se bloquean en la fase G1. Sin embargo, los mutantes estériles de *rum1Δ* y *ste9Δ* realizan una fase S adicional y se quedan parados en G2 (Stern y Nurse, 1998; Kominami *et al.*, 1998). Por otra parte, se observó que el doble mutante *rum1Δ ste9Δ*, aunque presenta niveles más elevados de Cdc13, no tiene defectos mitóticos y la ciclina se degrada (Blanco *et al.*, 2000). Es posible que la degradación de Cdc13 en el mutante *rum1Δ ste9Δ* se produzca por el complejo APC/C-Cdc20.

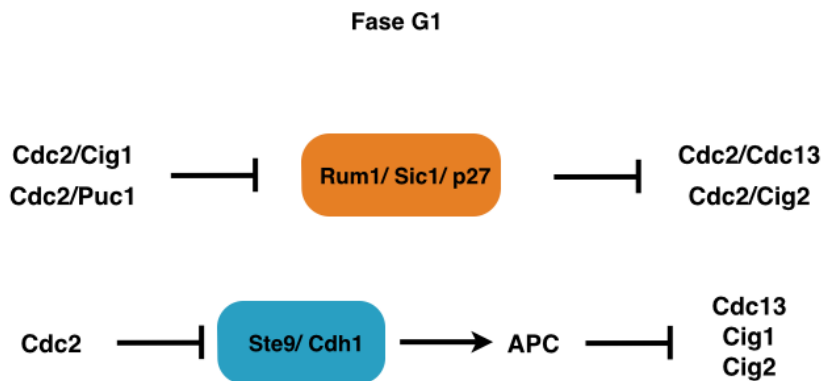


Figura 5. Rum1 y Ste9 definen la fase G1 en *S. pombe*.

En resumen, tanto Rum1 como Ste9 son necesarias para el bloqueo de las células en G1 en ausencia de nitrógeno, pero no para la salida de la mitosis.

6. La transición G2/M

La regulación del complejo Cdc2-Cdc13 en la transición G2/M se produce a través de mecanismos de fosforilación y desfosforilación. Para que se active el complejo, Cdc2 debe estar fosforilado en el residuo de treonina 167 (T167) y desfosforilado en el residuo de tirosina 15 (Y15) (Gould y Nurse, 1989; Gould *et al.*, 1991). La fosforilación activadora del residuo T167 está catalizada por unos complejos CAK (del inglés, **CDK-Activating Kinase**): el complejo Msc6, homólogo del complejo Cdk7-ciclina H de eucariotas superiores, y la proteína Csk1, ortóloga de Cak1 en *S. cerevisiae* (Lee *et al.*, 1999). La fosforilación de este residuo estabiliza el complejo CDK-ciclina y deja totalmente expuesta la región de unión con el sustrato (Russo *et al.*, 1996).

El residuo Y15 se encuentra muy cerca de la zona de unión al ATP y cuando se fosforila inhibe completamente la actividad de Cdc2-Cdc13, puesto que impide la unión del ATP, necesario para la actividad quinasa (Gould y Nurse, 1989; Gould *et al.*, 1991). La fosforilación de Y15 y, por tanto, la inhibición de Cdc2, la lleva a cabo principalmente la quinasa Wee1 y en menor medida, la quinasa Mik1 (Russell y Nurse, 1987; Featherstone y Russell, 1991). Así, las células que carecen de *wee1*⁺ presentan una activación prematura del complejo Cdc2-Cdc13, lo que provoca que las células entren en mitosis antes de haber alcanzado el tamaño suficiente (Nurse, 1975). Por otra parte, aunque la delección de *mik1*⁺ no provoca ningún fenotipo, es letal en combinación con *wee1-50* (Lundgren *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1994). De esta forma, ambas quinasas actúan para impedir la entrada prematura en mitosis. Sin embargo, mientras que Wee1 regula el inicio de la mitosis en función del tamaño celular, Mik1 se encarga de impedir la entrada en mitosis durante la replicación del DNA (Baber-Furnari *et al.*, 2000).

La desfosforilación del residuo Y15 y, por tanto, la activación de Cdc2-Cdc13 para la entrada en mitosis la lleva a cabo la fosfatasa Cdc25 (Millar *et al.*, 1991). Los niveles de expresión y de proteína de Cdc25 oscilan a lo largo del ciclo celular, siendo máximos en G2/M (Moreno *et al.*, 1990). De forma opuesta a Wee1, la inactivación de Cdc25 impide la activación de Cdc2-Cdc13 y la entrada en mitosis. Por este motivo, las células se quedan bloqueadas en G2 (Russell y Nurse, 1986). En definitiva, el balance entre la quinasa Wee1 inhibidora y la fosfatasa Cdc25 activadora determinará el momento en el que las células inicien la mitosis. Cdc25 y Wee1 confluyen una serie de rutas que integran las señales nutricionales, de tamaño celular, de geometría celular y de daño en el DNA que se encuentra conservado en todos los eucariotas (Russell *et al.*, 1989; Boher *et al.*, 1993; McGowan y Russell, 1993; Campbell *et al.*, 1995).

7. Regulación de la transición G2/M

En *S. pombe*, la ruta de respuesta a estrés SRP (del inglés **Stress Response Pathway**) por la MAP quinasa Sty1 y la ruta de la quinasa Pom1, que permite detectar la geometría celular, regulan la actividad de Cdc25 y de Wee1, respectivamente.

La MAP quinasa Sty1 se activa en respuesta a limitación de nutrientes para promover la entrada prematura en mitosis. Tras el cambio nutricional se reduce la actividad de la fosfatasa de Sty1, Pyp2, lo que induce la activación de Sty1 (Millar *et al.*, 1995). Esta quinasa, a su vez, fosforila a la Polo quinasa Plo1 y la recluta al SPB, donde promueve la actividad de Cdc2-Cdc13 a través de la activación de Cdc25 e inhibición de Wee1 (Petersen y Nurse, 2007; Petersen y Hagan, 2005).

La ruta de la quinasa Pom1 también regula a Wee1 manteniéndolo inhibido hasta que las células alcanzan un determinado tamaño. Cdr1 y Cdr2 son dos quinasas inhibitoras de Wee1 que se localizan en los nodos corticales de la célula. Pom1 se encuentra en los extremos de la célula y es capaz de inhibir a Cdr1 y Cdr2, manteniendo a Wee1 activa durante G2. Sin embargo, cuando las células alcanzan un determinado tamaño, el gradiente de Pom1 en los polos deja de inhibir a Cdr1 y Cdr2 en la vecindad del núcleo, lo que da lugar a la inactivación de Wee1, a un incremento de la actividad CDK y a la entrada en mitosis (Martin y Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley *et al.*, 2009).

Por otra parte, en nuestro laboratorio se ha descrito recientemente que la ruta de Ppk18-Igo1 (**Figura 6**), ortóloga a la de Greatwall-Ensa en células animales (Lorca y Castro, 2013), activa la entrada prematura en mitosis y la división a un menor tamaño cuando las células crecen con una fuente pobre de nitrógeno. Esta ruta regula la actividad de la fosfatasa PP2A con la subunidad reguladora Pab1, ortólogos de PP2A-B55 en mamíferos (Kinoshita *et al.*, 1996). PP2A-Pab1 inhibe la activación de Cdc2 y antagoniza la fosforilación de las dianas de CDK, es decir, es un regulador negativo de la transición G2/M.

Cuando las células se transfieren a un medio pobre en nitrógeno, la quinasa Ppk18 se activa y fosforila a Igo1, una proteína de pequeño tamaño que se une directamente al complejo PP2A-Pab1 y lo inhibe. De esta forma, la ruta de Ppk18-Igo1 promueve la transición G2/M a través de la inhibición de PP2A-Pab1 (**Figura 6**). De manera que células que carecen del inhibidor *igo1⁺* presentan un retraso en G2/M, mientras que células delecionadas para *ppa2⁺*, una de las dos subunidades catalíticas de PP2A, tienen una entrada acelerada en mitosis (Chica *et al.*, 2016).

Por otro lado, esta ruta se encuentra inhibida en medios ricos debido a la acción del complejo TORC1 (del inglés *Target Of Rapamycin, Complex 1*). En la levadura de fisión, el complejo TORC1 actúa como el principal elemento sensor de nutrientes para acoplar el crecimiento de las células a las condiciones nutricionales. Está formado por Tor2, cuyo gen es esencial, y Mip1 (Raptor en humanos) entre otras proteínas. TORC1 regula procesos como la transcripción y la traducción, la biogénesis de ribosomas, la autofagia y el metabolismo. Así, la exposición de las células a un ambiente nutricional desfavorable da lugar a la inhibición de TORC1, a la represión de procesos anabólicos y la activación de la autofagia (revisado en Otsubo y Yamamoto, 2008; Davie y Petersen, 2012).

Consistente con estos resultados, los mutantes termosensibles del complejo TORC1, como *tor2-51*, en medios ricos mimetizan un fenotipo de ausencia de nitrógeno (Matsuo *et al.*, 2007) a la temperatura restrictiva, activan la ruta de Ppk18-

Igo1 y presentan una entrada prematura en mitosis y división a un menor tamaño celular (Chica *et al.*, 2016).

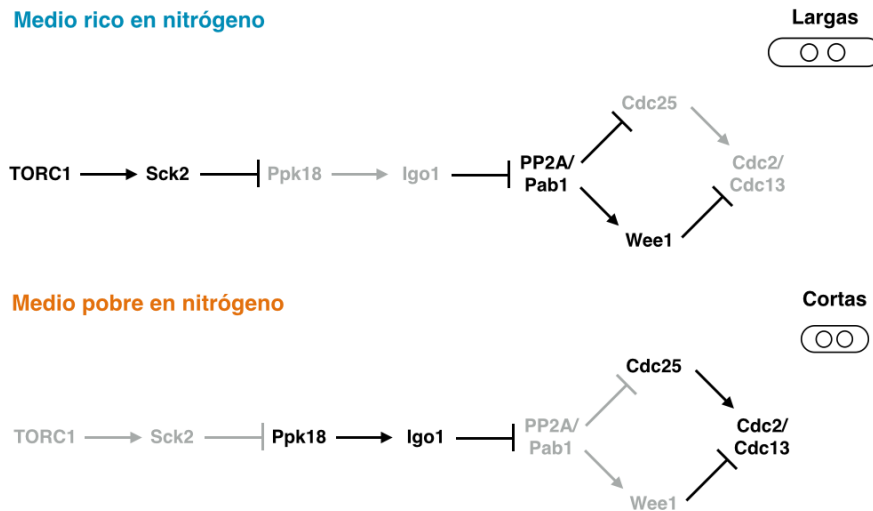


Figura 6. Ruta Ppk18-Igo1 en *S. pombe*. Esta ruta, ortóloga de Gwl-Ensa de mamíferos, se encarga de coordinar el tamaño celular en respuesta a las condiciones nutricionales del medio.

8. Inicio de la fase S

Durante la fase S, el DNA genómico debe duplicarse adecuadamente para proporcionar una copia a cada célula hija. Para ello, es importante que la replicación ocurra sólo durante la fase S y que el material genético se duplique solamente una vez en cada ciclo celular. La re-replicación, la replicación incompleta del DNA o la replicación fuera de la fase S promueven la inestabilidad genómica y el desarrollo de células cancerosas en humanos (revisado en Bell y Dutta, 2002).

El inicio de la replicación requiere la identificación y activación de orígenes de replicación que se distribuyen a lo largo del genoma. A diferencia de *S. cerevisiae*, y como ocurre en la mayoría de los eucariotas, en *S. pombe* no hay secuencias consenso para los orígenes, aunque suelen estar localizadas en zonas ricas en AT y tener una longitud aproximada de 1 Kb (Okuno *et al.*, 1999; Segurado *et al.*, 2003; revisado en Forsburg, 2004).

Se ha establecido que algunos de los orígenes que se activan en todos los ciclos celulares, son muy eficientes y se disparan temprano al inicio de la fase S, mientras que otros que parecen activarse de forma aleatoria en algunos ciclos para asegurar que la replicación sea completa, son menos eficientes y se disparan de forma tardía (revisado en Bell y Dutta, 2002; Heichinger *et al.*, 2006). Esto podría deberse a una competición entre los orígenes por los factores limitantes de iniciación. De esta manera, los factores de iniciación se reclutan preferentemente en los orígenes

tempranos durante la fase G1 y solo en los orígenes tardíos durante la fase S (Wu y Nurse, 2009).

El primer paso en el inicio de la replicación es el ensamblaje de los complejos pre-replicativos (pre-RCs, del inglés *pre-Replicative Complexes*), un proceso conocido como licenciamiento de los orígenes. Para ello, se requiere la carga de los complejos de seis subunidades ORC (del inglés *Origin Recognition Complex*), que también tienen otras funciones en la cromatina. En los orígenes de replicación, ORC se une a Cdc6 (Cdc18 en *S. pombe*) y a Cdt1 durante la fase G1. A su vez, estos factores permiten la carga alrededor del DNA de doble cadena y en forma de hexámero doble del complejo MCM2-7 (del inglés, *minichromosome maintenance*), que va a ser el elemento central de la helicasa replicativa. Sin embargo, estos complejos MCM también se unen a otras zonas de la cromatina para activarse en caso de estrés replicativo y poder asegurar que la replicación sea completa (Ge *et al.*, 2007). La formación de estos complejos pre-RC comienza al final de la mitosis del ciclo anterior, cuando la actividad CDK baja, y se produce solamente durante la fase G1, puesto que una alta actividad CDK inhibe el licenciamiento (revisado en Forsburg, 2004; Hills y Diffley, 2014; Bruck *et al.*, 2015).

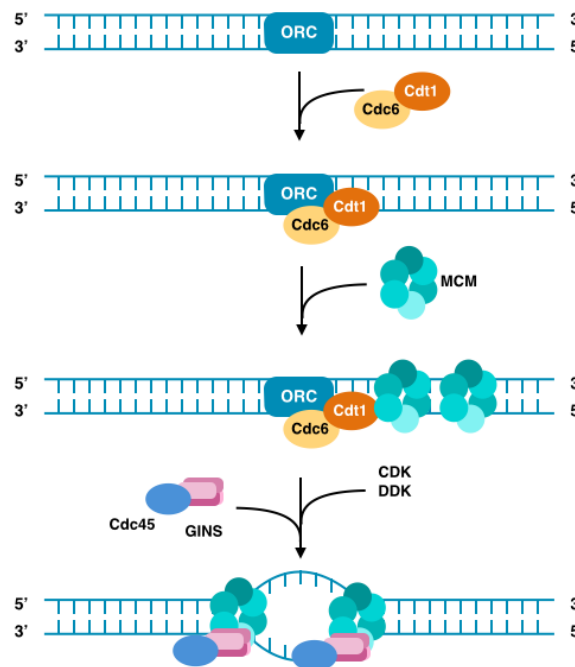


Figura 7. Ensamblaje de complejos pre-RC y disparo de orígenes de replicación (adaptado de Forsburg, 2004).

Para el disparo de orígenes de replicación y la activación de la helicasa en la transición G1/S se requiere la actividad de las quinasas CDK y DDK (del inglés, *Dbf4-dependent kinase*). Esta última está formada por una subunidad catalítica Cdc7 (Hsk1 en *S. pombe*) y una subunidad reguladora Dbf4 (Dfp1 en *S. pombe*). Estas dos quinasas permiten el reclutamiento de Cdc45 y el complejo heterotetramérico GINS

(del japonés **Go**, **Ichi**, **Nii**, **Sans** y formado por Psf1-3 y Sld5 en *S. pombe*) para formar el complejo CMG (**Cdc45/Mcm2-7/GINS**). Este complejo CMG permite la activación de la helicasa y el desenrollamiento del DNA (Gambus *et al.*, 2006; Ilves *et al.*, 2010).

Así, DDK se encarga de fosforilar a las subunidades Mcm2, Mcm4 y Mcm6 del complejo MCM, lo que promueve la carga de Cdc45. Por otro lado, y de forma similar a lo que ocurre en *S. cerevisiae*, CDK promueve la interacción entre Drc1 (Sld2 en *S. cerevisiae*), Sld3 y Cut5 (Dpb11 en *S. cerevisiae*), tres factores necesarios para la carga de Cut5 en los orígenes, lo que también promueve la formación del complejo CMG (Noguchi *et al.*, 2002; Fukuura *et al.*, 2011). Aunque previamente la proteína Cdc23 (Mcm10 en *S. cerevisiae* y mamíferos) se describió como una proteína implicada en la formación del complejo pre-RC (Homesley *et al.*, 2000) (**Figura 7**), se ha observado que se une a los orígenes tras la formación del complejo CMG. Cdc23 se requiere para el desenrollamiento del DNA por parte del complejo CMG, así como para la liberación de factores específicos de la iniciación como Drc1, Sld3 y Cut5 (Kanke *et al.*, 2012). Sin embargo, también se cree que Cdc23 tiene otras funciones durante la progresión de la horquilla, ya que permanece unido al replisoma.

Proteína	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Humanos
ORC 1-6	ORC 1-6	ORC 1-6	ORC 1-6
Mcm2-7	Mcm2-7	Mcm2-7	Mcm2-7
Dbf4	Dfp1	Dbf4	Dbf4
Cdc7	Hsk1	Cdc7	Cdc7
Cdc6	Cdc18	Cdc6	Cdc6
Cdt1	Cdt1	Cdt1/Sid2	Cdt1
Geminina	No homólogo	No homólogo	Geminina
Cdc45	Cdc45/Sna41	Cdc45	Cdc45
GINS:	GINS:	GINS:	GINS:
PSF2	PSF2	PSF2	PSF2/GINS2
PSF3	PSF3	PSF3	PSF3/GINS3
SLD5	SLD5	SLD5	SLD5/GINS4
PSF1	PSF1	PSF1	PSF1/GINS1
Drc1	Drc1	Drc1/Sld2	RecQL4
Sld3	Sld3	Sld3	Treslina/TICRR
Dpb11	Cut5, Rad4	Dpb11	TopBP1
Mcm10	Cdc23	Mcm10	Mcm10

Tabla 2. Proteínas de replicación conservadas. Adaptado de Forsburg, 2004.

Finalmente, cuando el DNA es desenrollado por la helicasa replicativa activa, la proteína RPA se une al ssDNA (del inglés, *single strand DNA*, DNA de cadena sencilla). Las polimerasas de DNA se reclutan en los orígenes y se forman los replisomas completos que darán lugar a la replicación del DNA (revisado en Forsburg, 2004).

9. La actividad CDK inhibe la re-replicación

La actividad CDK regula directamente el inicio del ensamblaje de complejos pre-RC y el disparo de los orígenes de replicación. De esta forma, tras una bajada de la actividad CDK en anafase, comienzan a formarse los complejos pre-RC. Al inicio de la fase S, al producirse un aumento de la actividad CDK, se promueve el disparo de los orígenes y el inicio de la replicación. A partir de este momento, la actividad CDK inhibe también el ensamblaje de nuevos complejos pre-RC y evita así el licenciamiento de orígenes que ya se han disparado hasta que las células acaban la mitosis (revisado en Hills y Diffley, 2014).

En *S. cerevisiae*, la actividad CDK promueve la fosforilación de Cdc6 que actúa como señal para su posterior ubiquitinación y proteólisis por parte de SCF^{Cdc4}, el exporte del núcleo de los complejos MCM y la inactivación de Orc2 y Orc6 (Drury *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 2000; Chen y Bell, 2011). En células de mamífero, la actividad CDK promueve la fosforilación de Cdt1 y Orc6 y posterior ubiquitinación y proteólisis mediada por SCF^{Skp2}, así como el exporte nuclear de Orc1. La fosforilación de Orc2 promueve su separación de la cromatina y la fosforilación de Cdc6 promueve su exporte del núcleo (Liu *et al.*, 2004; Saha *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2012; Petersen *et al.*, 1999). En eucariotas superiores, además, la geminina, que es una diana de APC/C y se encuentra en las células durante la fase S y la mitosis, se une a Cdt1 e inhibe su unión a la cromatina. Por otra parte, PCNA promueve la ubiquitinación y proteólisis de Cdt1 mediada por CRL4^{Cdt2}, que actúa durante la fase S (Melixetian *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2004; Senga *et al.*, 2006; revisado en Hills y Diffley, 2014). Esta enzima CRL4^{Cdt2} es una E3 ubiquitin ligasa que tiene una subunidad estructural llamada Cul4 y una subunidad reguladora, Ddb1. Cdt2 es el receptor que permite la unión del sustrato a Ddb1 (Havens y Walter, 2011).

En la levadura de fisión, la sobreexpresión de Cdc18 y Cdt1 durante la fase G2 promueve que las células inicien rápidamente y de forma descontrolada la síntesis de DNA (Nishitani y Nurse, 1995; Nishitani *et al.*, 2000; Yanow *et al.*, 2001). De esta forma, estas proteínas deben estar muy reguladas en el ciclo celular. Al igual que en otros organismos, Cdt1 también se ubiquitina y se degrada de forma dependiente de CRL4^{Cdt2} en respuesta a daño en el DNA, así como durante la fase S (Ralph *et al.*, 2006). Aunque la función de la degradación de Cdt1 durante el daño no está clara, se cree que podría estar relacionado con un mecanismo de compensación de la producción de dNTPs para evitar inestabilidad genómica. Esto se debe a que CRL4^{Cdt2} también promueve la degradación de Spd1 en respuesta a la activación del *checkpoint* de daño. Spd1 es un inhibidor de la RNR (ribonucleótido reductasa), que es la enzima encargada de la producción de dNTPs. Por tanto, la degradación de Spd1 estimula la producción de dNTPs en la célula (Liu *et al.*, 2005; Ralph *et al.*, 2006; Håkansson *et al.*, 2006). Además, se ha observado que PCNA unido al DNA es responsable de la ubiquitinación de Cdt1 durante la fase S y tras la inducción de daño en el DNA (Guarino *et al.*, 2011).

La actividad CDK también promueve directamente la ubiquitinación y degradación de Cdc18 y de Rum1 mediada por el complejo E3 ubiquitin ligasa SCF^{Pop1/Pop2},

ortólogo de SCF^{Cdc4} de *S. cerevisiae*. Esto permite a su vez el aumento de la actividad CDK y evita que se licencien nuevos orígenes durante la fase S (Kominami y Toda, 1997; Kominami *et al.*, 1998; Jallepalli *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 1999). Por otro lado, la unión del complejo Cdc2-Cdc13 a los orígenes de replicación durante la fase G2 y la mitosis impide la re-replicación. En ausencia de *cdc13⁺*, se producen ciclos de re-replicación en los cuales Cig2 se encarga de la degradación de Cdc18. De esta manera, Cig2 impide el re-licenciamiento de los orígenes durante la fase S, mientras que Cdc13 evita la formación de complejos pre-RC antes de que tenga lugar la mitosis (Wuarin *et al.*, 2002; Kiang *et al.*, 2009).

Una regulación adecuada del licenciamiento y del disparo de orígenes es crucial para la célula, puesto que si estas rutas se ven alteradas, el uso de los orígenes durante la fase S es aberrante. Por ejemplo, pueden utilizarse menos o más orígenes de los habituales, o volverse a disparar orígenes ya utilizados. Esto provoca situaciones de estrés replicativo e inestabilidad genómica, procesos directamente relacionados con el desarrollo de células tumorales (revisado en Hills y Diffley, 2014).

Para evitar estos procesos, existe solamente en mamíferos un *checkpoint* de licenciamiento dependiente de la proteína p53. Se ha descrito que el licenciamiento de los orígenes de replicación es necesario para el aumento de actividad de CDK4-Ciclina D y de CDK2-Ciclina E en la fase G1 (Machida *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009; Nevis *et al.*, 2009). Ambos complejos están implicados en la fosforilación de la proteína del retinoblastoma Rb, que regula negativamente la transición G1/S a través de la inhibición del factor E2F. La fosforilación de Rb por los complejos CDK provoca su disociación de E2F y la activación de este factor, lo que promueve la transcripción de genes diana y la entrada en fase S. Se ha demostrado que un licenciamiento insuficiente de orígenes da lugar a un bloqueo de las células en G1 y que esto va acompañado de la pérdida del incremento de actividad CDK y de menor fosforilación de Rb, de forma dependiente de la proteína p53 (Nevis *et al.*, 2009).

10. El *checkpoint* de daño en el DNA

Además del daño que se puede producir en las células de forma espontánea como consecuencia del metabolismo, éstas también pueden sufrir daño en el DNA de forma exógena. Por ejemplo, la radiación ultravioleta genera daño debido a la unión covalente de pirimidinas, lo que interfiere con la replicación. Por otra parte, el compuesto MMS (metilmetanosulfonato) genera mutaciones por metilación de bases del DNA y la radiación ionizante o la bleomicina genera roturas de doble cadena, DSB (del inglés, **Double Strand Breaks**). Asimismo, el tratamiento con HU (hidroxiurea) provoca la depleción de nucleótidos mediante la inhibición de la RNR, lo que causa la parada de las horquillas de replicación (Ciccia y Elledge, 2010).

Los *checkpoints* de integridad del genoma reconocen daño en el DNA o problemas en la replicación. Su función es asegurar una correcta replicación y reparación del DNA antes de la entrada en mitosis, puesto que el DNA no replicado o dañado puede causar graves problemas en la segregación cromosómica. En primer lugar, existen

proteínas del *checkpoint* encargadas de monitorizar el estado de la replicación o de la reparación. Estas proteínas van a interactuar con el DNA de cadena sencilla durante la fase S o bien con roturas en el DNA durante la fase G2. Si el *checkpoint* se activa, se desencadena la señalización de diferentes rutas celulares que van a permitir estabilizar las horquillas de replicación, reparar el DNA, alterar el programa transcripcional, remodelar la cromatina, promover la apoptosis y bloquear el ciclo celular. Así, el objetivo final del *checkpoint* es el retraso en la fase S o el bloqueo del ciclo celular en la fase G2, lo que proporciona el tiempo necesario para hacer frente a los daños (Furuya y Carr, 2003; Ciccio y Elledge, 2010).

Las diferentes lesiones que se producen en el DNA parecen tener una señal de activación común: DNA de cadena sencilla (ssDNA) recubierto por la proteína de replicación A (RPA), donde se ensamblan los complejos del *checkpoint* (Barnum y O'Connell, 2014, Zou y Elledge, 2003). La presencia de ssDNA en las horquillas durante la replicación se debe a un desacoplamiento entre las helicasas que desenrollan el DNA y el replisoma. Este desacoplamiento se puede producir por la presencia de dNTPs modificados, complejos DNA-proteína o la depleción de dNTPs (Furuya y Carr, 2003). Por otro lado, el origen del DNA de cadena sencilla cuando se generan DSBs, se debe a la resección de una de las dos cadenas del DNA (Langerak *et al.*, 2011).

La gran mayoría de las proteínas implicadas en la activación del *checkpoint* en *S. pombe* se encuentran conservadas a lo largo de la evolución (**Tabla 3**). Por orden de actuación son las siguientes: el complejo quinasa ATR-ATRIP (Rad3-Rad26 en *S.pombe* y Mec1-Ddc2 en *S. cerevisiae*), los complejos equivalentes a RFC, del inglés **Replication Factor C** (Rad17 y RFC2-5 en *S. pombe*) y a PCNA, del inglés **Proliferating Cell Nuclear Antigen**, (Rad9-Rad1-Hus1 o complejo 9-1-1 en *S. pombe*), las proteínas mediadoras Crb2 y Mrc1 y las quinasas efectoras Chk1 y Cds1 (Furuya y Carr, 2003). Aunque en la levadura de fisión Rad3-Rad26 fosforila muchas otras proteínas, Chk1 y Cds1 son esenciales en la activación del *checkpoint* (Rhind y Russell, 2000). El complejo Rad3-Rad26 se une al DNA recubierto por RPA y promueve el reclutamiento del complejo RFC (Zoy y Elledge, 2003). A su vez, el complejo RFC sirve para cargar al complejo 9-1-1, lo que permite unir a Rad3-Rad26 a sus mediadores para atraer a Cds1 y a Chk1 (Caspari y Carr, 2002).

Función	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Mamíferos
Sensores	Rad3 Tel1 Rad26	Mec1 Tel1 Ddc2	ATR ATM ATRIP
Adaptadores	Mrc1 Crb2	Mrc1 Rad9	CLASPINA -
Quinasas efectoras	Cds1 Chk1	Rad53 Chk1	CHK2 CHK1

Tabla 3. Proteínas del checkpoint conservadas desde levaduras a mamíferos.

dNTPs a través de la degradación de Spd1 (Liu *et al.*, 2003). Esta proteína es un inhibidor de la enzima RNR, que está formada por la subunidad pequeña Suc22 y la subunidad grande Cdc22. La degradación de Spd1 es dependiente de ubiquitinación y es necesaria para permitir el exporte nuclear de la subunidad pequeña Suc22 durante la replicación y durante la reparación en la fase G2. El exporte de Suc22 unido a la degradación de Spd1 permiten la formación de una enzima activa junto con Cdc22 en el citoplasma y la síntesis de dNTPs.

11. El complejo MBF

En la levadura de fisión, la decisión entre proliferación o diferenciación celular (conjugación seguida de meiosis) se produce en la fase G1 del ciclo celular. Para que las células continúen con la proliferación necesitan las actividades de la quinasa dependiente de ciclina Cdc2 y del factor de transcripción MBF (del inglés *Mlu1 Binding Factor*). Aunque no se conocen todos los sustratos de Cdc2, se piensa que parte de esa actividad está dirigida a la activación de MBF (Reymond *et al.*, 1993; Lowndes *et al.*, 1992). La expresión coordinada de los genes en las fases G1 y S es dependiente de los elementos MCB1 (del inglés *Mlu1 Cell cycle Box*) ACGCGT y MCB2, CGCGNCGCG (Rustici *et al.*, 2004). Los promotores de los genes diana de MBF contienen uno o más elementos MCB que sirven de plataforma de unión para MBF.

MBF, el ortólogo funcional de E2F de mamíferos, es un complejo multimérico que contiene al menos las proteínas Cdc10, Res1, Res2 y Rep2. Por un lado, Cdc10 es el elemento principal y originalmente fue descrito como esencial para la activación y periodicidad de MBF. Sin embargo, una versión truncada de Cdc10 que carece de 61 aminoácidos en el extremo C terminal, Cdc10-C4, mantiene activa la transcripción en G2, lo que sugiere que Cdc10 tiene un papel también en el apagado de la transcripción durante la fase G2 (Lowndes *et al.*, 1992; McInerney *et al.*, 1995).

Res1 y Res2 son dos proteínas estructuralmente homólogas con motivos de dedos de zinc que forman un dominio de unión a DNA heterodimérico en el extremo N terminal. En la región central poseen dominios estructurales de repeticiones de anquirina e interaccionan con Cdc10 por el extremo C terminal (Sturm y Okayama, 1996). A pesar de la similitud de ambas proteínas, Res1 y Res2 tienen funciones diferentes. Res1 es principalmente un activador puesto que la delección del gen que lo codifica genera células sensibles a alta y baja temperatura que se llegan a bloquear en G1, con una transcripción dependiente de MBF baja y constante durante el ciclo celular (Tanaka *et al.*, 1992; Caligiuri y Beach, 1993; Ayté *et al.*, 1995).

Por otra parte, Res2 no parece tener una función relevante en el ciclo celular mitótico. Aunque se considera un regulador negativo de MBF para inactivar la transcripción al final de la fase S y mantenerla baja durante la fase G2; sin embargo, la sobreexpresión de *res2*⁺ por sí sola no es capaz de reprimir la transcripción. Cuando se deleciona *res2*⁺, la transcripción es alta y constante durante el ciclo celular, aunque esto no genera ningún problema en las células para dividirse (Baum

et al., 1997). Otros estudios afirman que Res2 no es sólo un regulador negativo durante el ciclo mitótico, puesto que es capaz de unir a Rep2, un coactivador transcripcional del complejo MBF (Whitehall *et al.*, 1999). Los niveles de Res2 aumentan durante la diferenciación sexual y tiene un importante papel en la síntesis de DNA premeiótica y en la meiosis (Ayté *et al.*, 1997).

Los defectos de la delección de *res1*⁺ se pueden rescatar mediante la sobreexpresión de *res2*⁺, pero no al contrario, porque los defectos en meiosis de la delección de *res2*⁺ no se rescatan al sobreexpresar *res1*⁺ (Miyamoto, 1994; Zhu *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1997). De esta manera, se considera que ambas subunidades forman parte del complejo con Cdc10 y son necesarias para la periodicidad de la transcripción dependiente de MBF (Baum *et al.*, 1997). También se ha descrito que la estequiometría del complejo no varía durante el ciclo celular y que los niveles de las proteínas Cdc10, Res1 y Res2 permanecen constantes durante todo el ciclo (Whitehall *et al.*; 1999; Simanis y Nurse, 1989). De lo que se concluye que el control de la actividad de MBF no viene dado por la regulación de los niveles de proteínas de sus principales componentes.

El complejo de MBF contiene además otros elementos adicionales, como los activadores Rep1 y Rep2 (Nakashima *et al.*, 1995). Rep2 parece no contribuir a la periodicidad de la transcripción, pero sí al aumento de los niveles absolutos de los transcritos diana. En ausencia de Rep2, la transcripción es periódica pero mucho más reducida y no se requiere para aumentar la transcripción si Res2 está ausente (Baum *et al.*, 1997; Nakashima *et al.*, 1995). Esto se debe a que Rep2 posee un dominio de unión a Res2 y un dominio de activación transcripcional en el extremo C terminal que le permite unirse y activar al complejo MBF (Tahara *et al.*, 1998).

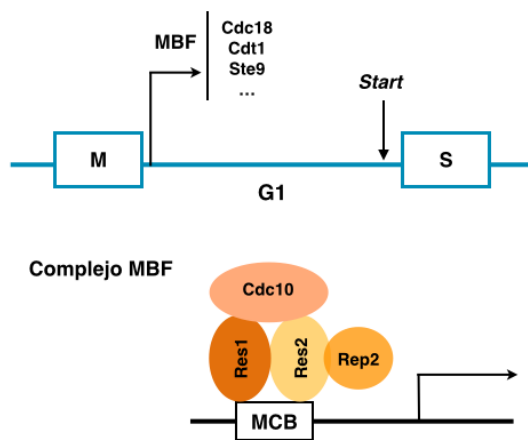


Figura 9. Modelo del complejo MBF. La transcripción dependiente de MBF comienza al principio de la fase G1 y permite el ensamblaje de complejos pre-RC antes de *Start*. El complejo MBF está formado por Cdc10, Res1, Res2 y Rep2.

Rep1 no tiene función en el control transcripcional de MBF durante el ciclo mitótico. Sin embargo, Rep1 se induce durante la meiosis y controla la síntesis de DNA a través de la inducción y activación de Res2 y de otros factores esenciales

independientes de la vía de Mei2 que son relevantes en el proceso de conjugación (Sugiyama *et al.*, 1994; Baum *et al.*, 1997).

Las proteínas Cdc10, Res1, Res2 y Rep2 se requieren todas para el control de la transcripción en un gran complejo que se une a los elementos MCB de los genes diana durante todo el ciclo (**Figura 9**) (Baum *et al.*, 1997). En ausencia de Res1 o Res2 desaparece la periodicidad, mientras que Rep2 es relevante para aumentar la eficiencia general del complejo.

11.1. Expresión de genes regulados por MBF

El complejo de MBF dirige la expresión dependiente de ciclo de genes que codifican para proteínas necesarias para la síntesis y reparación del DNA y en el control del ciclo celular (Lowndes *et al.*, 1992). Algunas de sus dianas bien conocidas son los factores de licenciamento de orígenes de replicación como *cdc18⁺* (ortólogo de Cdc6) y *cdt1⁺*, así como la subunidad grande de la enzima ribonucleótido reductasa *cdc22⁺*, encargada de la producción de dNTPs, o la ciclina de G1/S, *cig2⁺* (Kelly *et al.*, 1993; Fernández-Sarabia *et al.*, 1993; Hofmann y Beach, 1994; Lowndes *et al.*, 1992, Ayté J. *et al.*, 2001; Maqbool *et al.*, 2003).

MBF también regula la transcripción de Cdt2, un adaptador específico de sustrato del complejo E3 ubiquitin ligasa CRL4^{Cdt2} (Cul4-Ddb1) implicado en la degradación de Cdt1 y Spd1 de forma periódica en cada ciclo celular y en la respuesta a daño en las células (Ralph *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005; Moss *et al.*, 2010).

El regulador de APC/C Ste9 es otra diana del complejo MBF (Tournier y Millar, 2000). Dado que Ste9 se encarga de promover la degradación de Cdc13, se ha relacionado a MBF con el control de la actividad CDK para evitar la entrada en mitosis antes de que acabe la fase S. Una mutación en la subunidad Res2, que daba lugar a la pérdida de la periodicidad de la transcripción de genes diana de MBF, mostró un retraso en G2 que no era dependiente de la activación de los *checkpoints* de daño. En este mutante, la ciclina Cdc13 era inestable debido a una ineficiente represión de la transcripción de *ste9⁺* (Tournier y Millar, 2000).

La quinasa Mik1, un importante inhibidor de la mitosis junto con Wee1 a través de la fosforilación de Cdc2 en Y15, también es una diana del complejo MBF. Como se ha comentado anteriormente, Mik1 es diana de los *checkpoints* de fase S y de G2 para promover el retraso en la entrada en mitosis. Además, Mik1 es importante para prevenir la entrada prematura en mitosis durante la fase S (Ng *et al.*, 2001; Baber-Furnari *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2000).

Las proteínas Nrm1 y Yox1, son igualmente dianas de MBF que actúan como co-represor y represor de la transcripción dependiente de MBF, respectivamente (De Bruin *et al.*, 2006; Aligianni *et al.*, 2009).

Mediante el uso de microarrays de DNA procedente de células bloqueadas en mutantes de *cdc10⁺*, se han identificado los genes cuya regulación depende de MBF. Hasta ahora se piensa que MBF regula directamente la expresión de unos 40 transcritos (Rustici *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2005; Caetano *et al.*, 2014).

La hiperactivación de MBF da lugar a fenotipos de re-replicación del DNA e incremento de la ploidía, mientras que células con una baja actividad de MBF presentan problemas para completar la fase S. Por este motivo, es necesario una correcta regulación de la transcripción dependiente de MBF (Simanis y Nurse, 1989; Miyamoto *et al.*, 1994; Yanow *et al.*, 2001; Nishitani y Nurse, 1995).

Debido a que MBF se encuentra unido a los promotores de sus dianas durante todo el ciclo celular, se sabe que la regulación es compleja y no se produce solamente por la unión del complejo al DNA (Wuarin *et al.*, 2002).

11.2 Regulación de MBF por la actividad CDK

Cdc2 activa la expresión de genes dependientes de MBF al final de la fase G1. La actividad de MBF cae drásticamente en anafase, se mantiene baja durante la fase G1 y luego aumenta antes de la siguiente fase S (Reymond *et al.*, 1993). Cdc2 fosforila a Cdc10 en la serina 196. Esta fosforilación es necesaria para la unión de Cdc10 a Res1 y, por tanto, al DNA (Connolly *et al.*, 1997). Recientemente, se ha descrito que en la levadura de fisión, a diferencia de lo que ocurre en la levadura de gemación *S. cerevisiae*, la transcripción de los diferentes *clusters* a lo largo del ciclo celular dependen directamente de la actividad CDK, encargada de coordinar los eventos del ciclo celular con la transcripción periódica (Banyai *et al.*, 2016).

La transcripción dependiente de MBF se activa en mitosis posiblemente por fosforilación directa de Cdc2 sobre Cdc10. Sin embargo, los niveles altos de Cdc2-Cdc13 impiden la acumulación de Cdc18 hasta que las células acaban la mitosis. En G1, Cdc18 puede actuar en la formación de complejos pre-replicativos. Cuando las células en G1 alcanzan un tamaño suficiente y se han acumulado las ciclinas de G1, pasan el punto de control *Start* y la actividad CDK promueve el disparo de orígenes. En este punto, la replicación se inicia en presencia de transcritos diana de MBF. Al mismo tiempo, durante la fase S, Cdc18 también se desestabiliza por parte del complejo Cdc2-Cig2 y MBF se reprime, evitando así una nueva ronda de replicación (Baum *et al.*, 1998)

La ciclina Cig2 también es otra diana del complejo MBF (Obara-Ishibara y Okayama, 1994). Cdc2-Cig2 se une al complejo MBF a través de Res2 y promueve su represión a través de la fosforilación en la serina 130 de Res1. A su vez, esta fosforilación desestabiliza la unión de Cig2 al complejo MBF. El mecanismo molecular por el que la transcripción dependiente de MBF se reduce tras la fosforilación en Res1 se desconoce, aunque podría ser porque se separe Res2 del complejo y se pierda la unión al DNA o porque promueva la degradación del complejo MBF (Ayté *et al.*, 2001).

Este *feedback loop* negativo posibilita que el incremento de Cig2 durante la fase S favorezca la inactivación de la expresión de *cig2⁺*, así como de otras dianas de MBF (**Figura 10**). La transcripción de *cdc18⁺* y de *cdt1⁺* se inicia en mitosis, pero la de *cig2⁺* al final de la fase G1 (Obara-Ishibara y Okayama, 1994). Esto permite que se acumulen suficientes niveles de Cdc18 y Cdt1 para iniciar una ronda de replicación y se reprima la expresión en la fase S. De esta forma, Cig2 inhibe a Cdc18 por dos

mecanismos: a nivel de transcripción y a nivel de proteína, al promover la degradación por el proteasoma. La redundancia de estos mecanismos sirve para evitar que la expresión desregulada de *cdc18⁺* o de *cdt1⁺* durante la fase G2 genere graves problemas de endoreduplicación y poliploidía.

En cuanto a los reguladores negativos, Nrm1 y Yox1, se observó que los niveles de la proteína Yox1 aumentan a medida que las células progresan por la fase S. Además, la delección de *yox1⁺* genera células con una activación constitutiva de la transcripción dependiente de MBF, similar a la delección de *nrm1⁺*. Estas células presentan un ligero retraso en la citoquinesis y son más largas que una cepa silvestre, lo cual sugiere que tras la fase S, estas células se encuentran comprometidas en la progresión por el ciclo celular. Las células carentes de Yox1 muestran un fenotipo de inestabilidad genómica mediante ensayos de pérdida del minicromosoma 16 (Gómez-Escoda *et al.*, 2011). En los últimos años, se ha descrito que células delecionadas para el gen de *nrm1⁺* presentan también fenotipos de inestabilidad genómica y células más largas (Caetano *et al.*, 2014).

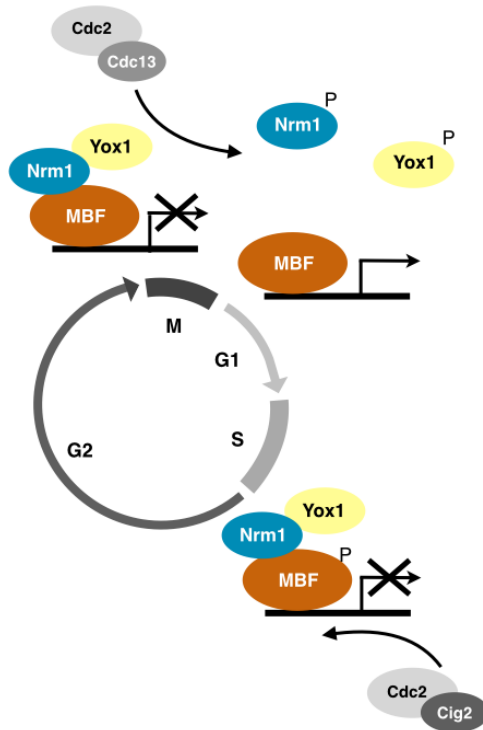


Figura 10. Regulación del complejo MBF por Cdc2-Cdc13 y Cdc2-Cig2. (Adaptado de Ivanova *et al.*, 2011). El complejo Cdc2-Cdc13 fosforila al represor y co-represor Yox1 y Nrm1, lo que promueve la activación de la transcripción dependiente de MBF. Cig2, junto con Nrm1 y Yox1, actúa en un mecanismo de *feedback loop* negativo para reprimir la transcripción dependiente de MBF al final de la fase S.

Yox1 se une a MBF a través de Nrm1 y de Res2 cuando MBF está unido a promotores que se encuentran reprimidos. De esta forma, Yox1 no se puede unir a MBF sin Nrm1. Sin embargo, en ausencia de Yox1, Nrm1 es capaz de unirse al

complejo MBF pero no puede reprimir la transcripción (Gómez-Escoda *et al.*, 2011). En resumen, Nrm1 es un co-represor que permite la unión del represor Yox1 y, junto con Cig2, forman parte de *feedback loops* negativos para reprimir la transcripción dependiente de MBF al final de la fase S.

Además, se ha descrito que el complejo Cdc2-Cdc13 es capaz de fosforilar a Yox1 en la serina 6 en células bloqueadas en anafase, justo cuando comienza la transcripción dependiente de MBF (Gómez-Escoda *et al.*, 2011). Por otro lado, se han identificado 11 sitios consenso de fosforilación por CDK en el co-represor Nrm1 que promueven su separación de la cromatina. Así, un mutante *nrm1-11A* permanece unido al complejo MBF tras la anafase impidiendo la inducción de la transcripción dependiente de MBF. La degradación de Nrm1 se lleva a cabo cuando está desfosforilado durante la fase G1 y está mediada por el proteasoma y el cofactor de APC/C, Ste9, que es uno de los genes regulados por el complejo MBF. En consonancia con esta idea, la sobreexpresión de Ste9 promueve la degradación de Nrm1 (J. Ayté, comunicación personal).

De esta manera, se considera que la actividad CDK podría estar regulando la activación de MBF en la anafase a través de diferentes mecanismos redundantes y de una forma compleja (**Figura 10**) (Ivanova *et al.*, 2011).

11.3 Regulación de MBF por los *checkpoints* de replicación y de daño

La respuesta del *checkpoint* comienza con la activación de la quinasa Rad3 (ATR en mamíferos) y activa por fosforilación a las quinasas efectoras Chk1 y Cds1. En la levadura de fisión, Chk1 responde principalmente a daño en el DNA, mientras que Cds1 se activa en respuesta a horquillas de replicación paradas. Por tanto, Cds1 es la quinasa efectora del *checkpoint* de replicación del DNA y juega un papel esencial en el bloqueo de la progresión por el ciclo celular, en la estabilización de las horquillas de replicación bloqueadas, así como en la reparación de defectos en la replicación mientras las células están bloqueadas. Para llevar a cabo estas funciones, se ha descrito que Cds1 promueve la inducción de genes de fase S mediante la activación de MBF (Chu *et al.*, 2007).

Una de las dianas de Cds1 es Cdc10, que posee posibles sitios de fosforilación por Cds1 en el extremo C terminal. Mutantes fosfomiméticos de estos residuos presentan niveles altos de transcripción dependiente de MBF, lo que rescata la sensibilidad de los mutantes *rad3Δ* o *cds1Δ* al tratamiento con HU (Dutta *et al.*, 2008). Por otro lado, Cds1 también es capaz de fosforilar *in vitro* a Nrm1. Sin embargo, células del mutante fosfonulo en los sitios de fosforilación identificados no presentan un fenotipo claro, lo que sugiere que Nrm1 es solamente una de varias dianas de Cds1 (De Bruin *et al.*, 2008; Travesa *et al.*, 2012). Además, se ha descrito que la degradación del activador transcripcional de MBF, Rep2, está mediada por APC/C y que Cds1 fosforila e inhibe a Ste9 para promover la acumulación de Rep2 (Chu *et al.*, 2007, Chu *et al.*, 2009).

Más recientemente, se ha propuesto que Yox1 y Nrm1 se disocian de los promotores en respuesta a estrés replicativo y que Cds1 fosforila directamente a Yox1 en los residuos de serina 114 y treonina 115 (**Figura 11**). La mutación de estos

residuos a alanina impide la fosforilación de Yox1 en respuesta al tratamiento con HU, Yox1 permanece unido a MBF y no se activa la transcripción dependiente de MBF (Purtill *et al.*, 2011, Gómez-Escoda *et al.*, 2011, Caetano *et al.*, 2011).

Del mismo modo, el *checkpoint* de daño en el DNA cuya respuesta está mediada por la quinasa Chk1 también regula al complejo MBF (**Figura 11**). Sin embargo al contrario que Cds1, Chk1 promueve la represión de los genes de fase S a través de la fosforilación de Cdc10 en las serinas 720 y 732. Estas serinas se localizan en el extremo C terminal de Cdc10, que es esencial para la carga de Yox1 y Nrm1 en la cromatina. Tanto Cdc10 como Res1, Res2 y Yox1 se liberan de la cromatina tras un tratamiento con MMS, lo que sugiere que todo el complejo se separa de la cromatina tras la activación del *checkpoint* de daño, posiblemente para impedir la progresión por el ciclo celular hasta que el DNA no esté reparado. Hay que tener en cuenta que la separación de Cdc10 en respuesta a la activación de Chk1 es diferente en distintos promotores de genes diana de MBF. Este dato sugiere que Chk1 podría estar regulando la unión de Cdc10 sólo a un subgrupo de genes (Ivanova *et al.*, 2013).

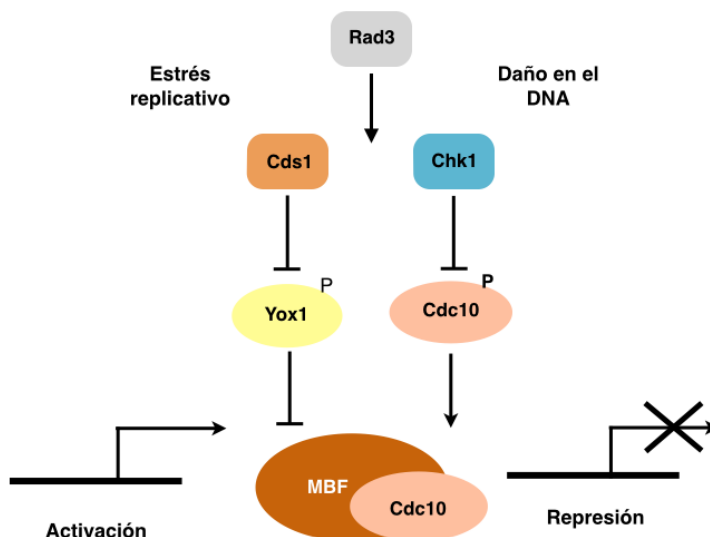


Figura 11. Regulación del complejo MBF en respuesta al *checkpoint* de integridad del DNA. (Adaptado de Ivanova *et al.*, 2013). Mientras que el *checkpoint* de daño en G2 promueve la represión de la transcripción dependiente de MBF, el *checkpoint* de estrés replicativo favorece su activación.

En resumen, la levadura de fisión utiliza los mecanismos que regulan normalmente la transcripción de MBF durante el ciclo celular para hacer frente a situaciones de estrés replicativo o de daño. Por este motivo, aunque una mayor expresión dependiente de MBF en los mutantes *yox1Δ* o *nrm1Δ* pueda proporcionar una mayor resistencia a estrés replicativo inducido por HU, también genera inestabilidad genómica. Es decir, que la inducción de estos transcritos de forma aberrante y fuera de la fase S provocan daño en el DNA y un retraso en la progresión por el ciclo celular dependiente de Chk1 y Mik1 (Gómez-Escoda *et al.*, 2011, Caetano *et al.*, 2014).

11.4 Regulación de MBF por TORC2

En la levadura de fisión *S. pombe*, el complejo TORC2 está formado por Tor1, Ste20 (Rictor en humanos) y Sin1 (mSin1 en humanos). Este complejo está implicado en la supervivencia celular en diferentes situaciones de estrés, como altas o bajas temperaturas, estrés oxidativo u osmótico, así como daño en el DNA o estrés replicativo. Además, es esencial para la entrada en fase estacionaria G0 y para la conjugación en respuesta a estrés nutricional (Schonbrun *et al.*, 2009; 2013). En condiciones de crecimiento estándar, TORC2 juega un importante papel en la regulación de la mitosis a través de la ruta de las MAP quinasas (Pyp2-Sty1) y de la Polo quinasa, Plo1 (Petersen y Nurse, 2007). También controla el transporte de aminoácidos (Weisman *et al.*, 2005), el silenciamiento de genes y el mantenimiento de la longitud de los telómeros (Schonbrun *et al.*, 2009).

La mayoría de las funciones de TORC2 están mediadas por la fosforilación de la AGC-like quinasa Gad8, ortólogo funcional de AKT en mamíferos (Ikeda *et al.*, 2008). Aunque se ha descrito que es el complejo TORC1 el principal encargado de regular el crecimiento en función de la disponibilidad de nitrógeno (Álvarez y Moreno, 2006; Matsuo *et al.*, 2007), el complejo TORC2 responde a la disponibilidad de glucosa o fuentes de carbono (Cohen *et al.*, 2014; Hatano *et al.*, 2015).

Células carentes de *tor1⁺* o de *gad8⁺* son sensibles a HU, MMS o camptotecina, que también provoca daño en el DNA, y son capaces de activar la respuesta al *checkpoint*. Además, estas células acumulan altos niveles de daño en el DNA, lo que sugiere problemas de reparación o sensibilidad al colapso de horquillas de replicación (Schonbrun *et al.*, 2009; 2013). Recientemente, se ha demostrado que Gad8 se une a MBF y promueve el incremento de la transcripción en respuesta a estrés replicativo inducido por HU. Esta activación es independiente de la fosforilación de Yox1 por parte de Cds1 y de la activación de Chk1, ya que en los mutantes *tor1⁺* o de *gad8⁺* Yox1 se fosforila con normalidad. Por otra parte, Tor1 y Gad8 promueven la estabilización de la proteína Cdt2, necesaria para la degradación de Cdt1 (Cohen *et al.*, 2016).

12. E2F en mamíferos

De forma similar al mecanismo anteriormente descrito en *S. pombe*, el ortólogo funcional de MBF en mamíferos, E2F, se encuentra regulado por actividad CDK. El represor transcripcional Rb se fosforila por Cdk4-Ciclina D, lo que promueve la disociación de Rb del promotor E2F y la desrepresión de la transcripción de genes necesarios para la entrada en fase S (revisado en Dimova y Dison, 2005, Kitagawa *et al.*, 1996). Una vez las células entran en fase S, la transcripción de E2F se inactiva por mecanismos que implican *feedback loops* negativos (**Figura 13**, revisado en Bertoli *et al.*, 2013a).

De igual forma, la transcripción dependiente de E2F se mantiene alta en respuesta a estrés replicativo en el DNA. Esto se produce a través de la fosforilación de Chk1 sobre el represor E2F6, lo que promueve la disociación de los promotores y favorece

la supervivencia (Bertoli *et al.*, 2013b). También ha sido descrito en células de mamífero una conexión entre el checkpoint de daño y la activación del programa transcripcional G1/S. Se ha visto que Chk2 fosforila a Rb y favorece su unión a E2F, es decir, el checkpoint de daño favorece la represión de la transcripción dependiente de E2F (Inoue *et al.*, 2007).

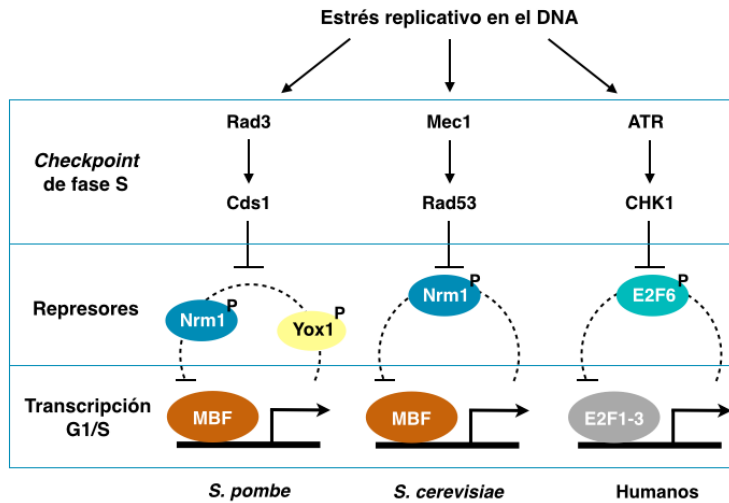


Figura 12. Regulación del complejo MBF/E2F en respuesta al *checkpoint* de estrés replicativo (Adaptado de Bertoli *et al.*, 2013). El aumento de la transcripción dependiente de MBF mediado por el *checkpoint* de estrés replicativo está conservado desde levaduras hasta humanos.

Finalmente, se la ruta Rb-E2F se encuentra desregulada en muchos tipos de tumores (Chen *et al.*, 2009). En condiciones de estrés replicativo inducido por oncogenes, una alta transcripción de E2F promueve la proliferación y, al mismo tiempo se requiere para evitar niveles altos de daño en el DNA como respuesta al estrés replicativo (Bertoli *et al.*, 2016).

Objetivos

1. Caracterizar el fenotipo de la falta de los reguladores negativos de la fase G1 del ciclo celular Rum1 y Ste9 en medios con una fuente pobre de nitrógeno.
2. Estudiar la desregulación de la transcripción dependiente de MBF en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en medio pobre en nitrógeno (MMF).

Resultados

El estudio de los mecanismos moleculares que regulan el ciclo celular en levaduras y en células animales se ha llevado a cabo generalmente en condiciones de laboratorio, empleando medios de cultivo ricos en nutrientes. Sin embargo, en la naturaleza los organismos crecen y se dividen en hábitats con distintas concentraciones de nutrientes. Las células de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* presentan unas diferencias notables de tamaño y de distribución de las fases del ciclo celular dependiendo del estado nutricional del medio. En medios ricos en nitrógeno, presentan un crecimiento rápido, un tamaño celular de unas 14 μm en el momento de la división celular y un ciclo celular con una fase G1 corta (10% del ciclo celular) y una fase G2 larga (70% del ciclo del ciclo celular); en cambio, en medios pobres en nitrógeno, el crecimiento esta levadura es más lento, el tamaño celular es menor (10 μm), la fase G1 se alarga (30% del ciclo celular) y la fase G2 se acorta (30% del ciclo celular). Además, tras el cambio de medio de cultivo la distribución relativa de las fases del ciclo celular se lleva a cabo en la primera división celular, acortando G2 (si el cambio es de medio rico a medio pobre) o alargando G2 (si el cambio es de medio pobre a medio rico).

En este trabajo hemos decidido revisar el papel de los reguladores negativos del ciclo celular Rum1 y Ste9 en células crecidas en medios pobres en nitrógeno, donde la fase G1 del ciclo celular se alarga. En la mayoría de los experimentos que se describen en esta sección las células se crecieron en medios de cultivo líquidos definidos a 32°C, salvo cuando se especifica otra temperatura. Las distintas cepas mutantes que se han construido en combinación con *rum1 Δ* y *ste9 Δ* se generaron mediante transformaciones, puesto que ambas deleciones generan células estériles. Además, todas las cepas analizadas son protótrofas, de manera que el medio de cultivo contenía una única fuente de nitrógeno: medio mínimo con cloruro amónico o glutamato, como fuente rica en nitrógeno y medio mínimo con fenilalanina, como fuente pobre en nitrógeno.

1. La proteína Rum1 se acumula y Ste9 se desfosforila en MMF

Cuando las células de la cepa silvestre de *S. pombe* se transfieren de medio mínimo con cloruro amónico (MM) a medio sin nitrógeno (MM-N) completan dos ciclos celulares y se bloquean en la fase G1 del ciclo celular. En estas condiciones, tanto los niveles de los RNA mensajeros del gen *rum1*⁺ como los de la proteína Rum1 se acumulan en MM-N (Martín-Castellanos *et al.*, 2000; Daga *et al.*, 2003). En paralelo, la proteína Ste9, que normalmente está fosforilada y dissociada del complejo APC/C, se desfosforila y presenta una mayor movilidad en geles de poliácridamida (Blanco *et al.*, 2000). La acumulación de Rum1 y la desfosforilación de Ste9 son necesarios para la parada en la fase G1 del ciclo celular de estas células.

Con objeto de determinar si al transferir las células de la cepa silvestre de medio rico en nitrógeno (medio mínimo con glutamato, en adelante MMGlu) a medio pobre en nitrógeno (medio mínimo con fenilalanina, en adelante MMF) se produce la acumulación de Rum1 se tomaron muestras de células a distintos tiempos tras el cambio a MMF y se confirmó que, efectivamente, los niveles de Rum1 aumentan progresivamente a partir de los 40 minutos (**Figura 1A**).

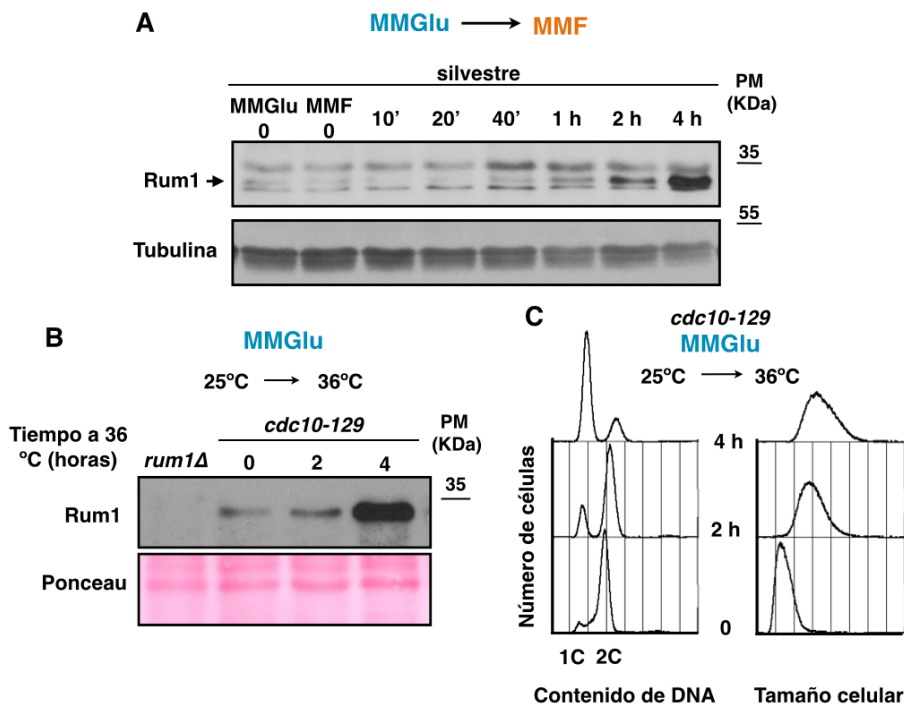


Figura 1. Los niveles de la proteína Rum1 tras el cambio de MMGlu a MMF. A. *Western blot* de la acumulación de la proteína Rum1 a distintos tiempos tras un cambio de medio de MMGlu a MMF. **B.** *Western blot* de la acumulación de la proteína Rum1 tras un bloqueo en G1 mediante inactivación de Cdc10 en el mutante *cdc10-129* a la temperatura restrictiva. **C.** Histogramas de citometría de flujo correspondientes a las muestras del *western blot* de la Figura 1B.

La proteína Rum1 también se acumula en células del mutante termosensible *cdc10-129* bloqueadas en G1. Este mutante se creció en MMGlu a la temperatura permisiva (25°C) y luego se transfirió a 36°C durante 4 horas. Estas células acumulan niveles elevados de Rum1 a medida que se bloquean en G1 (**Figura 1B y 1C**).

Para confirmar estos resultados, se prepararon cultivos de la cepa silvestre y de la cepa *HA-rum1* que expresa la proteína Rum1 etiquetada con 3 copias del heptapéptido HA en el extremo amino-terminal. Esta cepa se comporta de manera similar a la cepa silvestre y no presenta ninguno de los fenotipos descritos para la delección del gen *rum1*⁺ (esterilidad, letalidad sintética en combinación con los mutantes *cdc10-129* o *wee1-50*), lo cual indica que este alelo de *rum1*⁺ es funcional. Las células se crecieron en MMGlu y se pasaron durante 4 horas a MM sin nitrógeno (MM-N) o a MMF. El uso de la cepa *HA-rum1* permitió separar las bandas inespecíficas para visualizar mejor la proteína Rum1, dado que migra con un peso molecular mayor debido a la presencia de las tres copias del epítipo HA (**Figura 2A**, panel superior). Es importante señalar que las células en MM-N a las 4 horas aún no se han bloqueado en G1. Por este motivo, el pico 1C de contenido de DNA que se observa en los histogramas de citometría de flujo es similar al que se puede ver en MMF, con la diferencia de que en MMF este pico no aumentará con el tiempo (**Figura 2B**). La proteína Rum1 se acumulaba en MMF pero en menor medida que en MM-N. Por otro lado, la cantidad de proteína Ste9 mostró un ligero aumento en MMF, pero no en MM-N. También se observó un incremento en la movilidad electroforética, más evidente en MM-N que en MMF, que podría corresponder a la proteína menos fosforilada y por tanto, más activa (**Figura 2A**, panel inferior).

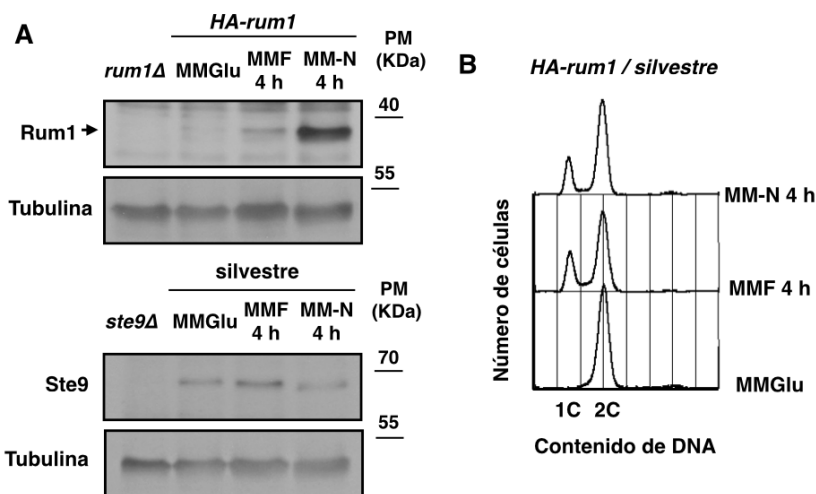


Figura 2. Proteínas Rum1 y Ste9 en MMF. A. Western blot de la acumulación de la proteína Rum1 y cambio de la movilidad electroforética de Ste9 en MMGlu tras 4 horas en MMF o en MM-N. **B.** Histograma de contenido de DNA de una cepa *HA-rum1* o silvestre en las condiciones de la Figura 2B.

En resumen, al transferir las células de medio rico a medio pobre en nitrógeno aumenta la proporción de células en la fase G1 y se acumula la proteína Rum1.

Además, la proteína Ste9 presenta una movilidad electroforética mayor, lo cual indicaría que estaría desfosforilada y activa. Ambos mecanismos contribuyen a la extensión de la fase G1 del ciclo celular.

2. Rum1 y Ste9 son necesarios para la extensión de la fase G1 en MMF

Cuando las células de *S. pombe* crecen en MMF, se acorta la fase G2 y las células se dividen con un menor tamaño celular (Chica *et al.*, 2016). Como consecuencia, las células hijas extienden la fase G1 y crecen hasta alcanzar el tamaño mínimo necesario para iniciar la fase S (Fantes y Nurse, 1977; Nurse y Thuriaux, 1977; Nasmyth *et al.*, 1979).

Las células de los mutantes *rum1Δ*, *ste9Δ* o del doble mutante *rum1Δ ste9Δ* no presentan aparentemente ningún fenotipo en medios ricos (Moreno y Nurse, 1994; Blanco *et al.*, 2000). Por tanto, decidimos analizar el fenotipo de estos mutantes en medios pobres en nitrógeno. Para ello se transfirieron a MMF cultivos de la cepa silvestre y de los mutantes *rum1Δ*, *ste9Δ* y *rum1Δ ste9Δ*. Tras 17 horas de cultivo en MMF se analizó mediante citometría de flujo el contenido de DNA y el tamaño de las células. El tiempo de generación de *S. pombe* en MMF a 32°C es de 6 horas. Tanto los mutantes sencillos como el doble *rum1Δ ste9Δ* presentaron un pequeño hombro entre los picos 1C y 2C de contenido de DNA en lugar del pico 1C que mostró la cepa silvestre (**Figura 3**). El fenotipo era más acusado en el doble mutante, seguido del mutante *rum1Δ*. El tamaño de los tres mutantes resultó similar al de la cepa silvestre, aunque se aprecia una ligera cola hacia la derecha, compuesta por células de mayor tamaño, en el caso del doble mutante (**Figura 3**).

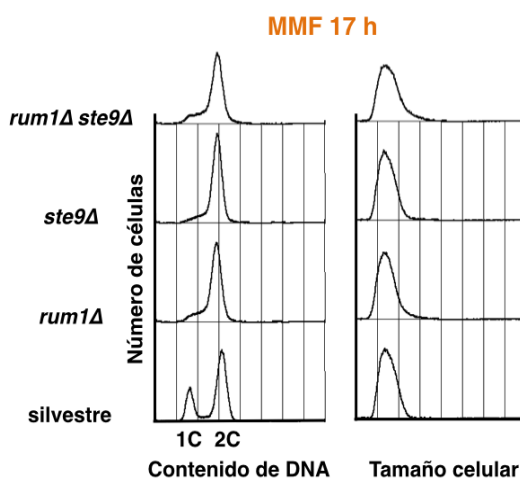


Figura 3. Los mutantes *rum1Δ*, *ste9Δ* y *rum1Δ ste9Δ* no presentan células en G1 en MMF. Histogramas de contenido de DNA y de tamaño obtenidos mediante citometría de flujo de los mutantes *rum1Δ*, *ste9Δ* y *rum1Δ ste9Δ* muestran que estos mutantes no pueden extender la fase G1 como la cepa silvestre.

Estos datos indican que las proteínas Rum1 y Ste9 son necesarias para la extensión de la fase G1 cuando las células crecen en medio con una fuente pobre de nitrógeno.

A partir de este momento, en el resto del trabajo se comparó la cepa silvestre con el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* puesto que esta cepa presentaba el fenotipo más claro que los mutantes sencillos.

3. El doble mutante *rum1Δ ste9Δ* entra prematuramente en fase S

Las células del doble mutante *rum1Δ wee1-50* entran de forma prematura en fase S independientemente de su tamaño celular (Moreno y Nurse, 1994). Para comprobar si el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* también presentaba una entrada prematura en fase S en MMF, se analizó el porcentaje de células que incorporaban bromodesoxiuridina (BrdU), un nucleótido sintético análogo a la timidina que sólo lo incorporan aquellas células que estén replicando su DNA. Para este experimento, se utilizó una cepa que expresa la enzima timidina quinasa del virus herpes simplex (*hsv-tk⁺*) bajo un promotor reprimible por tiamina *P3nmt1*. Las células se fijaron tras incubarlas en

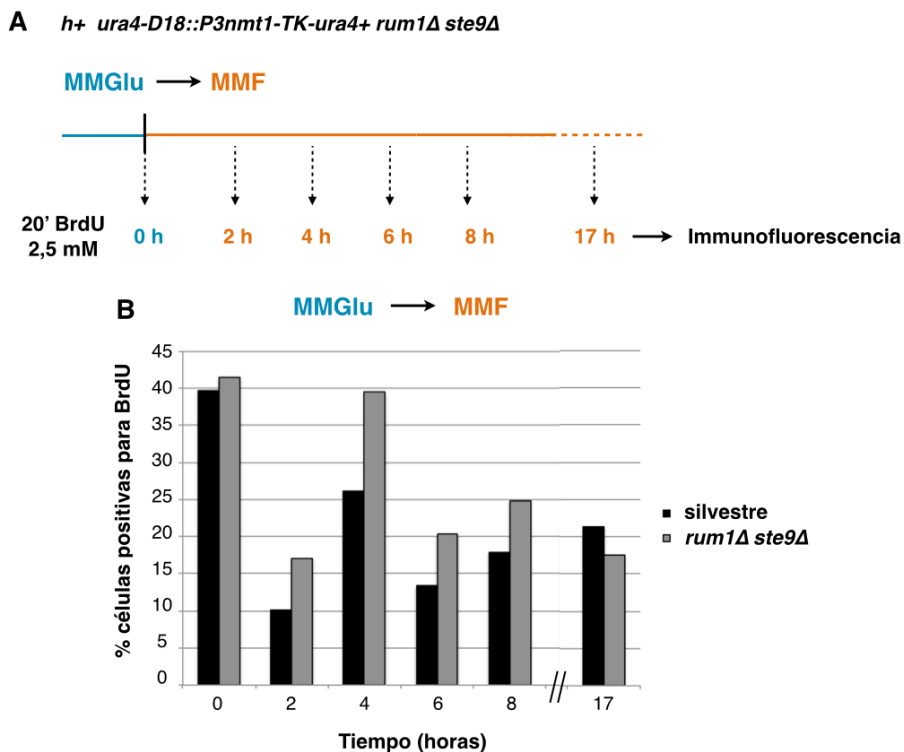


Figura 4. Porcentaje de células en fase S en la cepa silvestre y el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* tras un cambio a MMF. A. Metodología empleada. Los marcajes se iniciaron a las 0, 2, 4, 6, 8 y 17 horas y las células se incubaron durante 20 minutos en presencia de BrdU. **B.** Porcentajes de células positivas para BrdU en un total de 900-930 células. Los valores son más altos en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* que en la cepa silvestre, lo que indica una entrada en fase S prematura.

presencia de BrdU 2,5 mM durante 20 minutos y se analizó el porcentaje de células que habían incorporado el análogo mediante inmunofluorescencia con anticuerpos anti-BrdU (**Figura 4A**).

Es importante mencionar que tras el cambio de MMGlu a MMF se produce una sincronización parcial del cultivo debido a la entrada prematura en mitosis de las células que tienen mayor tamaño y que se encuentran al final de la fase G2 (Chica *et al.*, 2016). Como se observa en la **Figura 4B**, el porcentaje de células positivas para BrdU era más alto en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* que en la cepa silvestre.

Estos datos indican que las células del doble mutante *rum1Δ ste9Δ* entran en fase S de forma prematura al ser transferidas a MMF. Desafortunadamente, no se pudieron realizar medias para dar la significación estadística con otras dos repeticiones experimentales porque los valores difieren mucho entre sí de experimento a experimento, aunque en todos los casos la tendencia se conservaba. Es posible que las diferencias se deban a problemas de reproducibilidad de los experimentos derivados de la fijación, digestión de la pared celular y del uso de anticuerpos. A pesar de esto, los recuentos se realizaron con un número muy alto de células, mínimo 900.

4. El doble mutante *rum1Δ ste9Δ* presenta células alargadas bloqueadas en G2 y más células en fase S que la cepa silvestre

Las células del mutante *rum1Δ ste9Δ* en medios con una fuente rica de nitrógeno resultan indistinguibles de la cepa silvestre. Sin embargo, cuando se crecen durante 13 horas o más en MMF, el mutante *rum1Δ ste9Δ* presenta células alargadas cuyo número se va incrementando con el tiempo (**Figura 5A y 5B**).

Mediante tinción con Blankophor de las paredes y el septo de las células, se realizaron medidas de 600 células que se encontraron de forma aleatoria en el cultivo. De esta forma, se observó que el mutante *rum1Δ ste9Δ* presentaba una distribución de tamaño similar al de la cepa silvestre en MMGlu y en MMF a las 6 horas, que corresponde al primer ciclo celular en este medio. Sin embargo, tras el segundo ciclo (13 horas) comenzaron a aparecer células alargadas solamente en el mutante *rum1Δ ste9Δ* y las dos poblaciones tenían un tamaño celular significativamente diferente a las 20 horas (**Figura 5B**).

También se pudo observar de nuevo la ausencia de un pico de contenido 1C de DNA en el mutante *rum1Δ ste9Δ* y un ligero desplazamiento de la distribución del tamaño hacia la derecha de la curva (**Figura 6A**), que se corresponde con la aparición de células alargadas en el cultivo. El incremento de tamaño por citometría de flujo en el mutante *rum1Δ ste9Δ* se apreciaba mejor si se superponen los histogramas de la cepa silvestre y del mutante *rum1Δ ste9Δ* (**Figura 6A**).

En el mutante *rum1Δ ste9Δ* aumenta la población de células en el valle entre los picos 1C y 2C que representa a las células en fase S. Estas células del doble mutante *rum1Δ ste9Δ* tienen un tamaño pequeño dentro de la distribución general de la población (**Figura 6B**). Además, si se seleccionan las células alargadas, se observa

que estas células largas tienen un contenido de DNA 2C (**Figura 6C**).

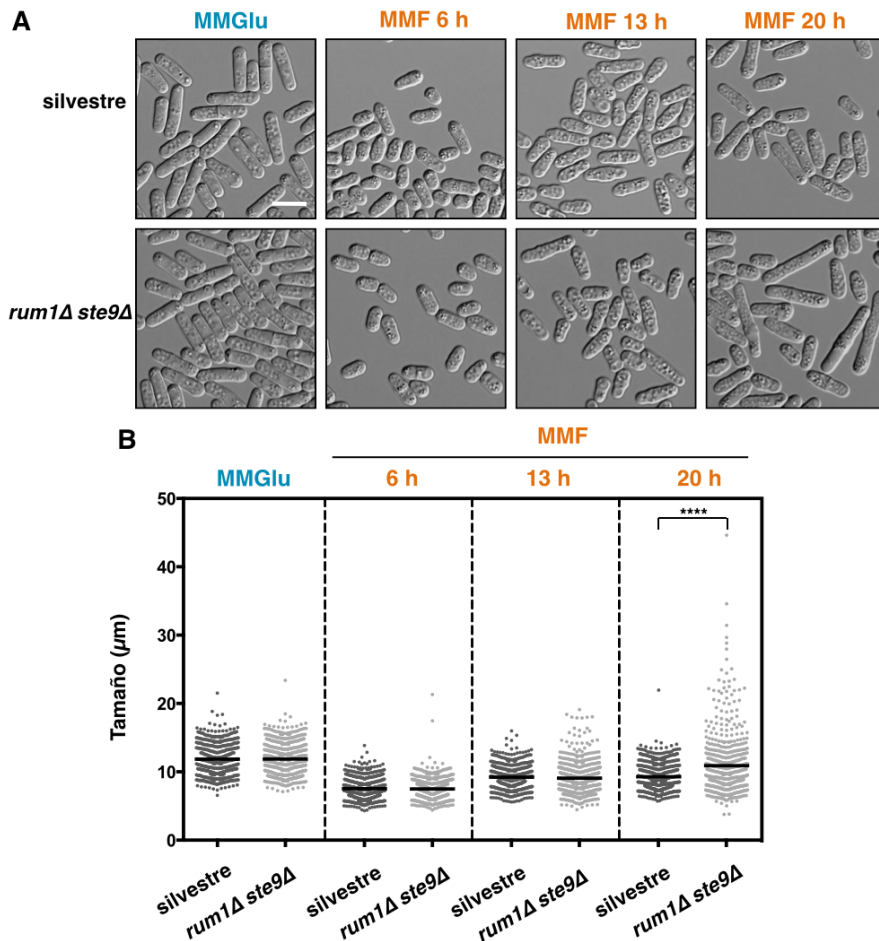


Figura 5. El mutante *rum1Δ ste9Δ* presenta células alargadas en MMF. A. Imágenes representativas DIC (del inglés, *Differential Interference Contrast*) de los cultivos de la cepa silvestre y del doble mutante *rum1Δ ste9Δ* *in vivo* a diferentes tiempos tras un cambio de MMGlu a MMF. La escala es de 10 μm . **B.** Valores de la longitud expresada en μm de 600 células en cultivo de las dos estirpes a diferentes tiempos medidos mediante tinción con Blankophor y microscopía de fluorescencia. La barra representa la media. (**** $p < 0,0001$).

En definitiva, el mutante *rum1Δ ste9Δ* es capaz de reducir su tamaño tras el cambio a medio pobre y, por tanto, de acelerar la entrada en mitosis y reducir la fase G2 con normalidad. Sin embargo, a partir del segundo ciclo celular (13 horas) en MMF, comienzan a detectarse, solamente en el mutante *rum1Δ ste9Δ*, células alargadas con un contenido 2C de DNA, lo que sugiere que estas células se encuentran bloqueadas en G2. Además, este mutante no extiende la fase G1 y presenta un mayor número de células entre los picos 1C y 2C, correspondiente a células en la fase S. **En conjunto, estos resultados sugieren que el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* podría presentar una fase S aberrante de mayor duración que la cepa silvestre como consecuencia del acortamiento de la fase G1 y la entrada prematura en fase S.**

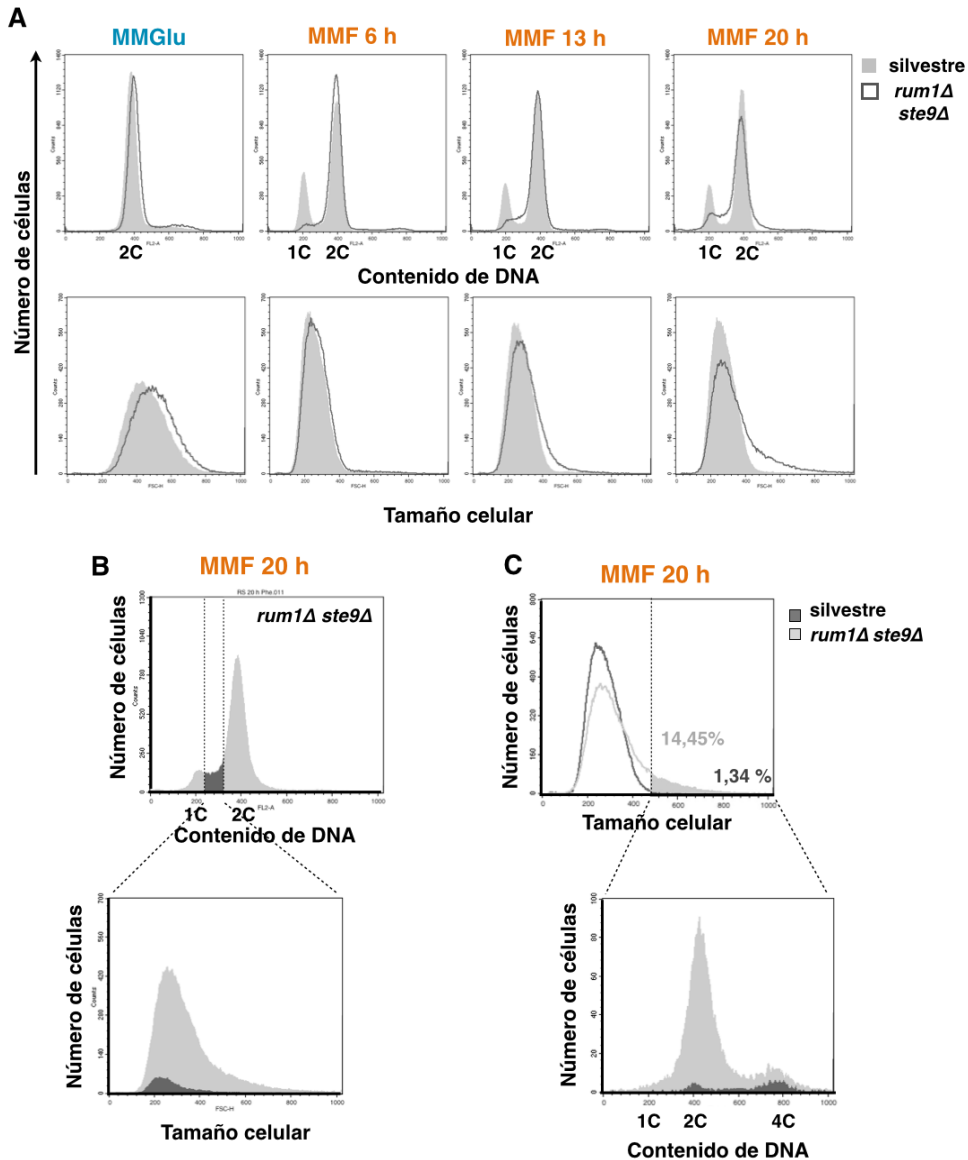


Figura 6. Las células largas del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF están bloqueadas en G2. **A.** Superposición de los histogramas de citometría de flujo del mutante *rum1Δ ste9Δ* y la cepa silvestre a diferentes tiempos tras un cambio de MMGlu a MMF. **B.** La selección de células entre los picos 1C y 2C del mutante *rum1Δ ste9Δ* son de un tamaño celular pequeño en comparación con el total de la población. **C.** La selección de células alargadas de las cepas silvestre y *rum1Δ ste9Δ* muestra principalmente un contenido 2C de DNA en el mutante *rum1Δ ste9Δ*.

Para estudiar las células en fase S, tras 20 horas de crecimiento en MMF se realizó un experimento de incorporación de BrdU a dos tiempos de exposición de 10 y 20 minutos (**Figura 7**). En el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF se detectó un menor porcentaje de células positivas para BrdU que puede deberse a un menor número de células proliferando y un mayor número de células bloqueadas en G2.

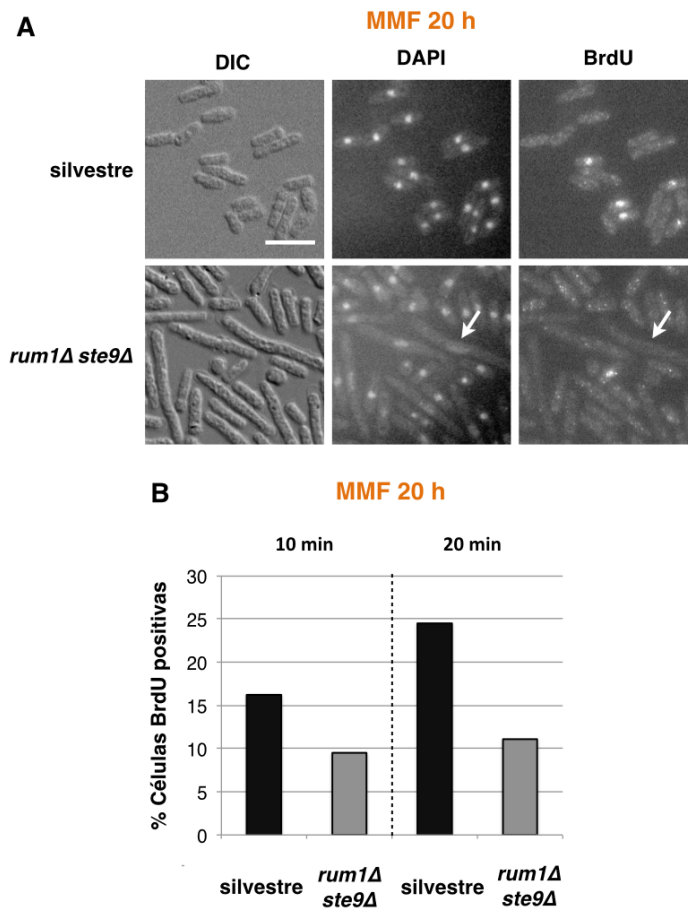


Figura 7. El mutante *rum1Δ ste9Δ* incorpora BrdU más lentamente. A. Imágenes representativas de células silvestres y del doble mutante *rum1Δ ste9Δ* fijadas con tinción DAPI de los núcleos e inmunodetección del BrdU incorporado. La escala es de 10 μ m. **B.** Cuantificación de los porcentajes de células positivas para BrdU a dos tiempos de exposición diferentes del mismo cultivo de células silvestres o mutantes *rum1Δ ste9Δ*. Se contaron un total de 400 células.

Las células alargadas retrasadas en G2 que aparecen en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* no eran positivas para BrdU (**Figura 7A**), por lo que no están en fase S como se indicaba en la figura anterior. Sin embargo, mientras que la cepa silvestre mostró un incremento en el porcentaje de células positivas para BrdU en un 50% de su valor inicial al doblar el tiempo de exposición, este no fue el caso en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ*, que apenas variaba en un 12% (**Figura 7B**).

Este resultado corrobora que las células largas que aparecen en el cultivo del doble mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF están bloqueadas en G2 y sugiere que la fase S es más lenta en el mutante que carece de Rum1 y de Ste9.

5. El mutante *rum1Δ* y *ste9Δ* acumula daño endógeno en el DNA en MMF

En la levadura de fisión, el alargamiento de las células sin septación es un signo del retraso en la fase G2 que puede generarse por la activación del *checkpoint* de daño del DNA. Por otro lado, una fase S más lenta es un indicio de estrés replicativo. Tanto el estrés replicativo como el daño en el DNA inducen la activación de *checkpoints* que promueven la inhibición de Cdc2 y un retraso en G2/M (Rhind y Russell, 2001).

El DNA dañado se puede detectar con la proteína Rad52 fusionada a YFP. Rad52-YFP presenta normalmente una señal nuclear difusa, con uno o varios focos brillantes en las zonas del núcleo donde el DNA se repara por recombinación homóloga. En respuesta a diferentes lesiones, como roturas de la doble cadena del DNA o a horquillas colapsadas, Rad52 permite la carga de proteínas de recombinación en el DNA generando focos de recombinación (Muris *et al.*, 1997) que suelen aparecer al final de la fase S o al inicio de la fase G2. En un cultivo asíncrono de la cepa silvestre de *S. pombe* sólo el 1% de las células presentan más de un foco de Rad52-YFP y el 10-14% de las células presentan un foco que corresponde a la reparación del DNA tras la replicación (Meister *et al.*, 2005; Bailis *et al.*, 2008; Sabatinos *et al.*, 2013).

Para determinar si el mutante *rum1Δ ste9Δ* presentaba daño en el DNA en MMF, se determinó el porcentaje de células con uno o más focos de Rad52-YFP. Las células se cultivaron durante 24 h en medio rico MMGlu, se lavaron con MMF y se incubaron en MMF. Se tomaron muestras en MMGlu y tras 6 y 20 horas en MMF y se determinó el porcentaje de células con un foco o con más de un foco de Rad52-YFP (**Figura 8A**). En MMGlu, el porcentaje de focos de Rad52-YFP es similar en el mutante que en la cepa silvestre, pero a partir de las 6 horas en MMF el porcentaje de células con focos de Rad52-YFP empezó a incrementar en el caso de mutante y a las 20 horas el 50% de las células del mutante presentaban uno o más focos brillantes de Rad52-YFP. Además, las células presentaban un fenotipo alargado característico de células con el *checkpoint* de daño en el DNA activado (**Figura 8B y 8C; Figura 9A y 9C**).

En un experimento similar se determinó el porcentaje de focos de Rad52 a tiempos más largos, 24 y 48 horas, en MMF. Como puede observarse en la **Figura 9**, a las 24 horas aproximadamente el 80% de las células presentaban focos de Rad52-YFP (más del 50 % presentaban 1 foco y más del 20% más de uno) (**Figura 9B**). A las 48 horas, el mutante presentaba también células con morfología aberrante (**Figura 9A**) y el cultivo dejaba de crecer. En los histogramas de citometría de flujo el mutante a las 48 horas mostró un pequeño pico de células con un contenido de DNA menor de 1C, así como una distribución más ancha del tamaño celular, debido a las células largas y con morfología aberrante (**Figura 9C**). Este pico de células con contenido menor a 1C de DNA es propio de células que llevan a cabo la citoquinesis en ausencia de una división normal. Esto genera células con cromosomas seccionados por el septo (fenotipo *cut*), cromosomas fragmentados, reparto desigual del material genético (*missegregations*), etc. Estos eventos son letales para las células y conforman el fenotipo de catástrofe mitótica (Saka y Yanagida, 1993).

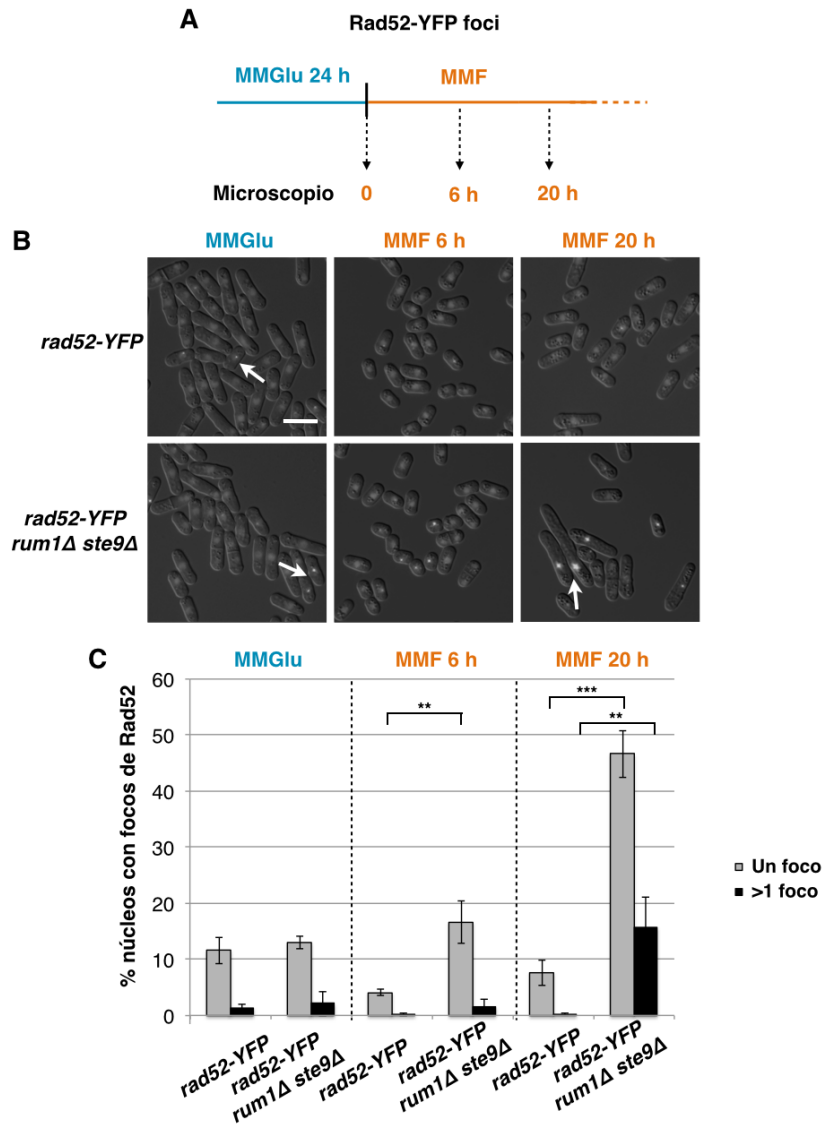


Figura 8. El mutante *rum1Δ ste9Δ* presenta células con focos de Rad52-YFP en MMF. **A.** Metodología empleada en los experimentos para determinar el porcentaje de células con focos de Rad52-YFP. **B.** Imágenes representativas de células *rad52-YFP* o *rad52-YFP rum1Δ ste9Δ* *in vivo*. Son proyecciones máximas de varias fotos en distintos planos en z de la fluorescencia, superpuesta con la imagen DIC de campo claro. Se aprecian focos de Rad52-YFP en las dos estirpes en MMGlu y focos muy intensos en el mutante *rad52-YFP rum1Δ ste9Δ* a 20 horas tras el cambio a MMF (flechas). La escala es de 10 μ m. **C.** Cuantificación de los porcentajes de núcleos con uno o más de un foco de Rad52. La media y desviación estándar procede de tres repeticiones experimentales. En cada repetición se contaron entre 500 y 520 núcleos. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Por otra parte, se estudió si el fenotipo de las células alargadas con daño en el DNA era reversible tras 24 horas en MMF. Para ello, se crecieron las células en placas de medios ricos (YES y MM) y en medio pobre (MMF) tras crecerlas en cultivos líquidos de YES y MMGlu o en MMF durante 24 horas (**Figura 10**).

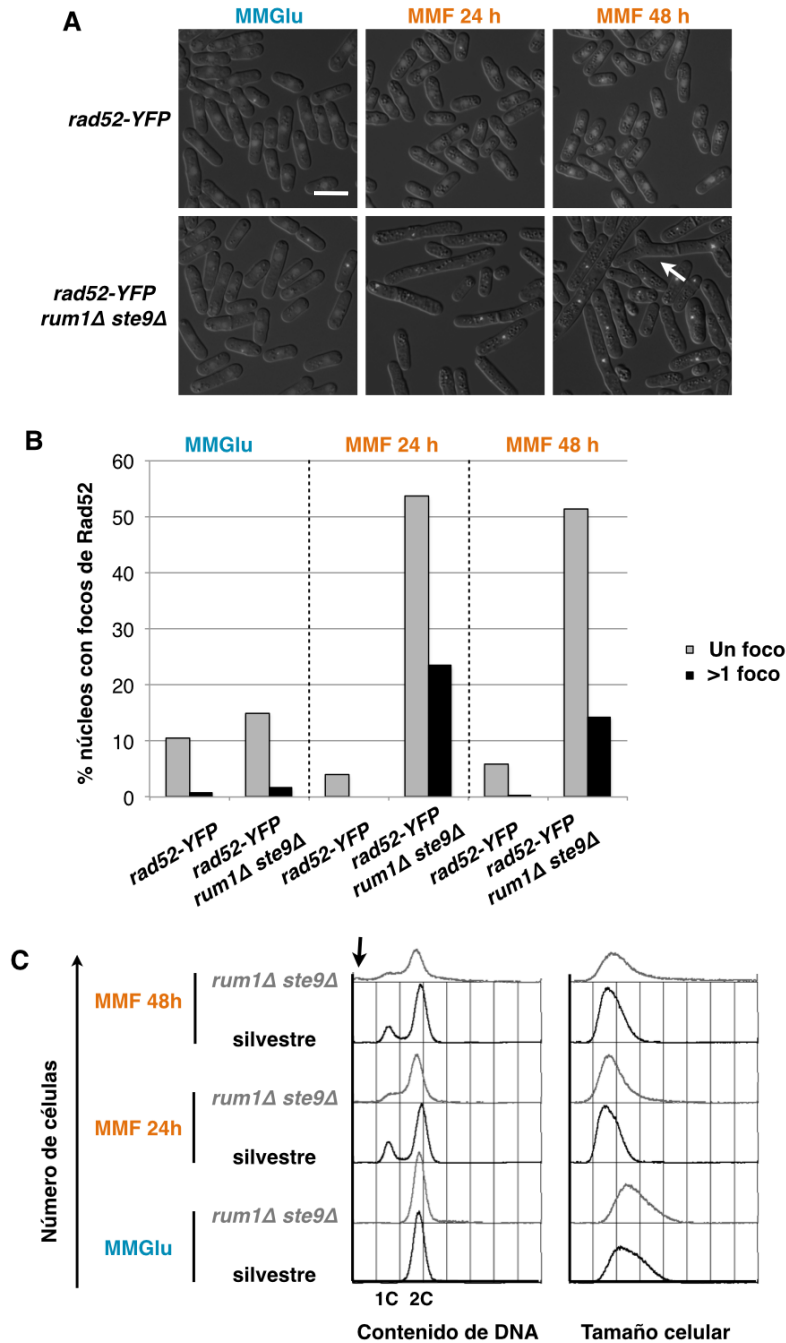


Figura 9. El mutante *rum1Δ ste9Δ* no es viable después de varias generaciones (4-8) en MMF. A. Imágenes de proyecciones máximas de varias fotos en distintos planos en z de la fluorescencia, superpuesta con la imagen DIC de campo claro. Se aprecia el elevado número de células alargadas con focos muy intensos de Rad52-YFP. Tras 48 en MMF algunas células presentaban fenotipo aberrante (flecha). La escala es de 10 μ m. **B.** Cuantificación en 500-520 células de los porcentajes de núcleos con uno o más de un foco de Rad52-YFP de un solo experimento. Los valores no aumentan entre 24 y 48 horas. **C.** Histogramas de citometría de flujo de contenido de DNA y tamaño. Tras 48 horas en MMF el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* presentó una población de células con un contenido de DNA inferior a 1C (flecha).

Las células del mutante *rum1Δ ste9Δ* presentaron el fenotipo de alargamiento en las placas de MMF y sólo en las placas de medio rico (YES y MM) tras crecerlas en MMF. Esto indica que el daño endógeno generado en el mutante tras el crecimiento en MMF es irreversible aunque las células se vuelvan a crecer en medios ricos (**Figura 10C**).

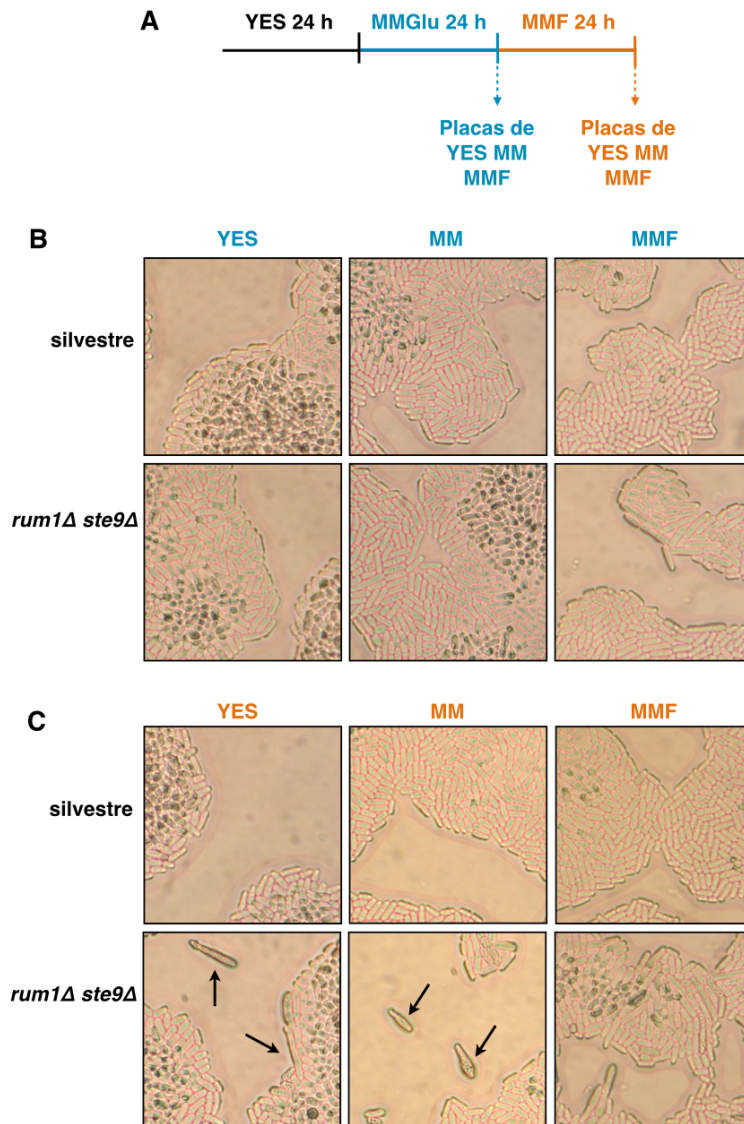


Figura 10. El daño en el mutante *rum1Δ ste9Δ* es irreversible. **A.** Metodología empleada en este experimento. **B.** Imágenes representativas del crecimiento de microcolonias en placas tras crecer en cultivos líquidos las cepas silvestre y *rum1Δ ste9Δ* en medios ricos. **C.** Imágenes representativas del crecimiento de microcolonias en placas tras crecer en cultivo líquido de MMF. Las flechas indican células largas bloqueadas.

Estos resultados indican que las células del mutante *rum1Δ ste9Δ* acumulan niveles muy altos de daño endógeno sólo cuando crecen en MMF. Este daño es acumulativo e irreversible a medida que pasa el tiempo y finalmente, las células acaban siendo inviables.

6. El papel de los *checkpoints* de integridad del DNA en la supervivencia del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF

Los *checkpoints* de integridad del DNA aseguran que el DNA se replique completamente y se repare antes de entrar en mitosis, puesto que material genético sin replicar o sin reparar puede dar lugar a una segregación cromosómica aberrante. En *S. pombe*, el *checkpoint* de fase S reconoce horquillas bloqueadas en la replicación y activa a la quinasa Cds1. Por otra parte, en respuesta a daño en el DNA se activa el *checkpoint* de daño en G2 y la quinasa efectora Chk1. Ambas respuestas están mediadas por la quinasa apical sensora Rad3. La activación de ambos *checkpoints* tienen como consecuencia el retraso en la fase S o el bloqueo del ciclo celular en la fase G2 mediante la inhibición del complejo Cdc2/Cdc13, lo que proporciona el tiempo necesario para responder a los daños (Furuya y Carr, 2003).

6.1 La viabilidad del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF depende de la quinasa Rad3

Con el objetivo de analizar la importancia de Rad3 en la viabilidad del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF, se construyó el mutante triple carente de *rad3⁺* y se estudió su fenotipo en MMF. Se observó que las células del triple mutante *rad3Δ rum1Δ ste9Δ* no se alargaban en MMF como lo hacía el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* (Figura 11A y 11B). Por tanto, el alargamiento de las células depende de la actividad de Rad3.

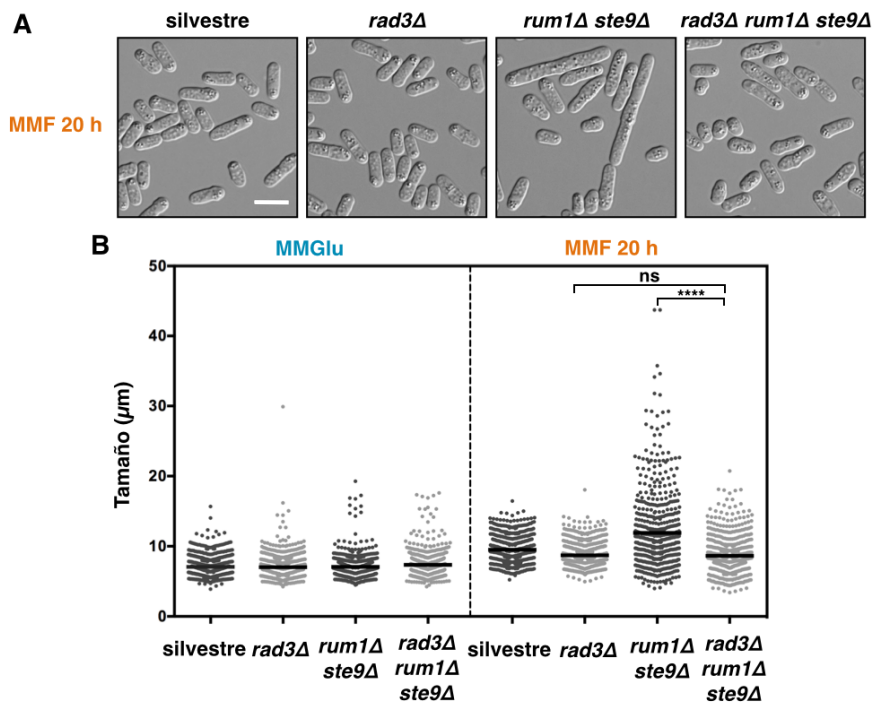


Figura 11. El alargamiento de las células en el mutante *rum1Δ ste9Δ* depende del *checkpoint*. **A.** Imágenes representativas de DIC. Escala de 10 μm. **B.** Representación del tamaño de 600 células en cultivo *in vivo* medidas sobre imágenes de microscopía de una tinción con Blankophor. La barra representa la media. (**** $p < 0,0001$).

Además, mediante la tinción con DAPI y Blankophor se detectó que las células del mutante *rad3Δ rum1Δ ste9Δ* presentaban un fenotipo de catástrofe mitótica (**Figura 12A**, flechas). Por otra parte, el perfil de contenido de DNA obtenido por citometría de flujo reveló una pequeña población de células con contenido de DNA por debajo de 1C, lo cual es indicativo de la aparición de células muertas en el cultivo (**Figura 12B**, flecha).

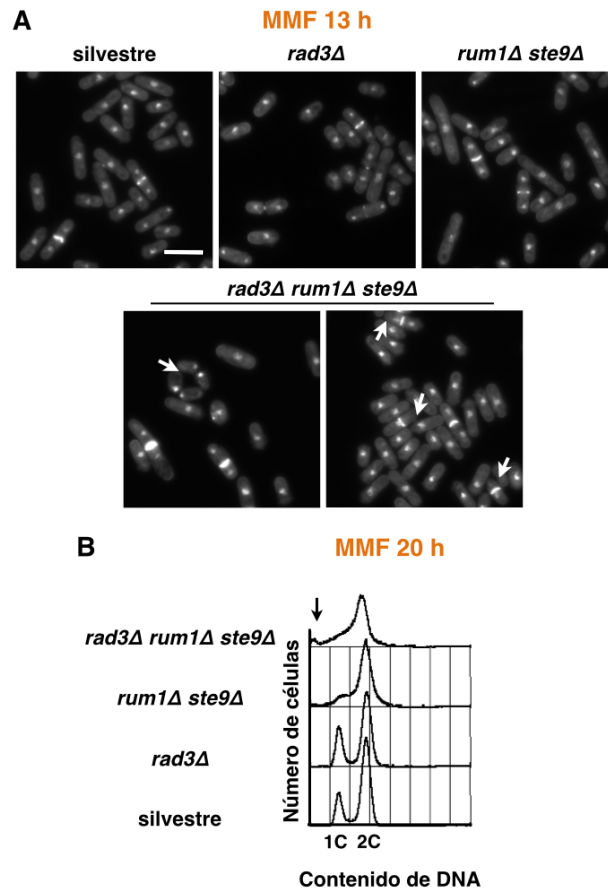


Figura 12. La delección de *rad3⁺* en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* genera un fenotipo de catástrofe mitótica. **A**. Imágenes representativas de células fijadas y con doble tinción de DAPI y Blankophor para núcleos y septos, respectivamente. Las flechas señalan células con fenotipos de catástrofe mitótica. Escala de 10 μm **B**. Histogramas de citometría de flujo del contenido de DNA. El mutante *rad3Δ rum1Δ ste9Δ* presentó una población de células con un contenido de DNA inferior a 1C (flecha).

En definitiva, estos datos sugieren que la quinasa Rad3 es necesaria para promover el alargamiento de las células del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF y que sin esta quinasa, las células pierden viabilidad rápidamente y presentan un fenotipo de catástrofe mitótica.

6.2 El alargamiento de las células del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF depende de la quinasa Chk1 que se activa a tiempos cortos

Para determinar si Chk1 era la quinasa responsable del alargamiento de las células del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF, comparamos el fenotipo de los triples mutantes sin *rad3⁺*, *chk1⁺* o *cds1⁺* tras 20 horas en MMF. Los triples mutantes *rad3Δ rum1Δ ste9Δ* y *chk1Δ rum1Δ ste9Δ* no mostraron células alargadas a diferencia del triple *cds1Δ rum1Δ ste9Δ* (Figura 13A). Sin embargo, por citometría de flujo el triple mutante *chk1Δ rum1Δ ste9Δ* no mostró un pico de contenido de DNA por debajo de 1C como el mutante *rad3Δ rum1Δ ste9Δ* (Figura 13B).

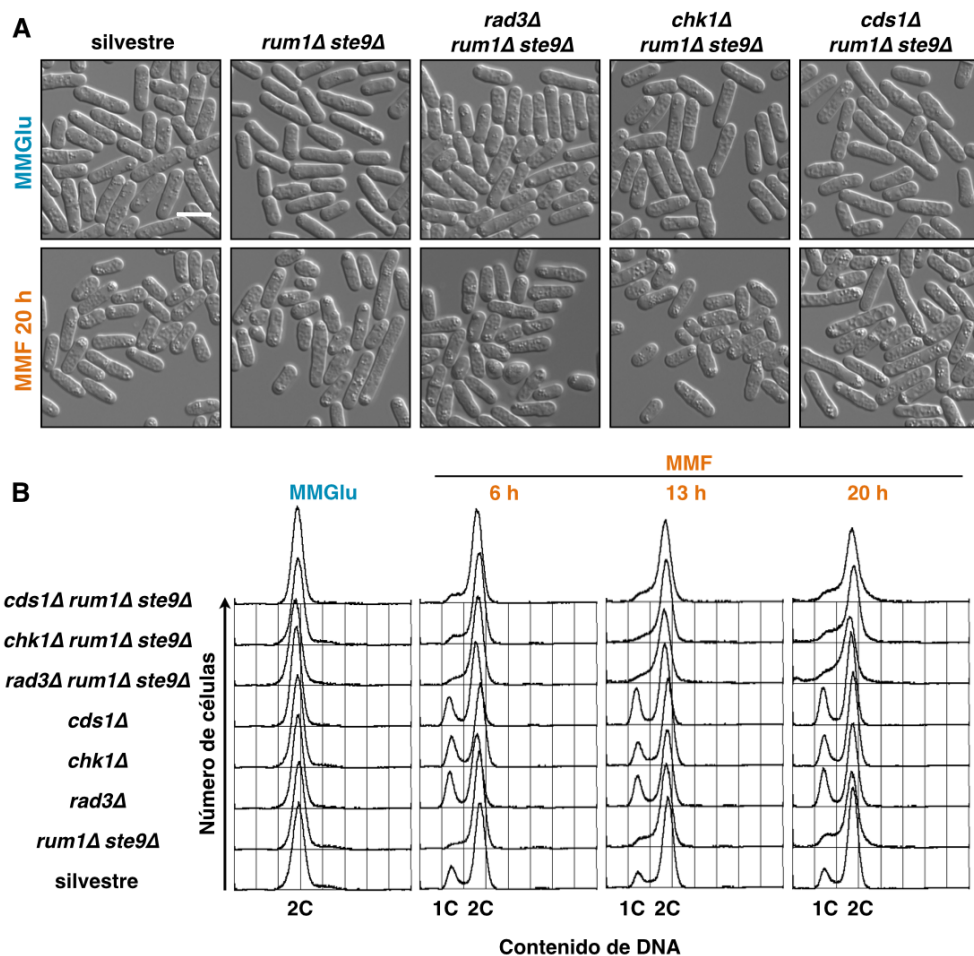


Figura 13. Rad3 y Chk1 son las quinases responsables del alargamiento de las células del mutante *rum1Δ ste9Δ*. A. Imágenes representativas de DIC. Los mutantes *rad3Δ rum1Δ ste9Δ* y *chk1Δ rum1Δ ste9Δ* no presentan células alargadas. Escala de 10 μ m. **B.** Histogramas de citometría de flujo del contenido de DNA. El mutante *chk1Δ rum1Δ ste9Δ* no presentó un pico menor de 1C a diferencia del mutante *rad3Δ rum1Δ ste9Δ*.

Estos datos sugieren que Rad3 promueve el alargamiento de las células a través de Chk1, no de Cds1. Sin embargo, el fenotipo de catástrofe mitótica del mutante *rad3Δ rum1Δ ste9Δ* no se explica solamente por la imposibilidad de activar Chk1 y promover

el alargamiento y bloqueo de las células en G2.

Dado que en ausencia de Chk1 las células del mutante *rum1Δ ste9Δ* no se alargan, analizamos por *western blot* si Chk1 se fosforila y se activa en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF. Como se muestra en la **Figura 14A**, parte de la proteína Chk1-HA presentó un retraso en la movilidad electroforética correspondiente a su activación solo en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF (Capasso *et al.*, 2002). La forma fosforilada de Chk1 se acumula muy pronto tras el cambio a MMF, visible a las 5 horas, lo que supone que la proteína se activa incluso antes de que acabe el primer ciclo celular tras el cambio (**Figura 14B**). También se analizó el estado de fosforilación de la quinasa Cds1-HA mediante *western blot* de un gel de Phos-tag en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF y no se detectó cambio de movilidad de esta quinasa efectora del *checkpoint* de fase S (**Figura 14C**).

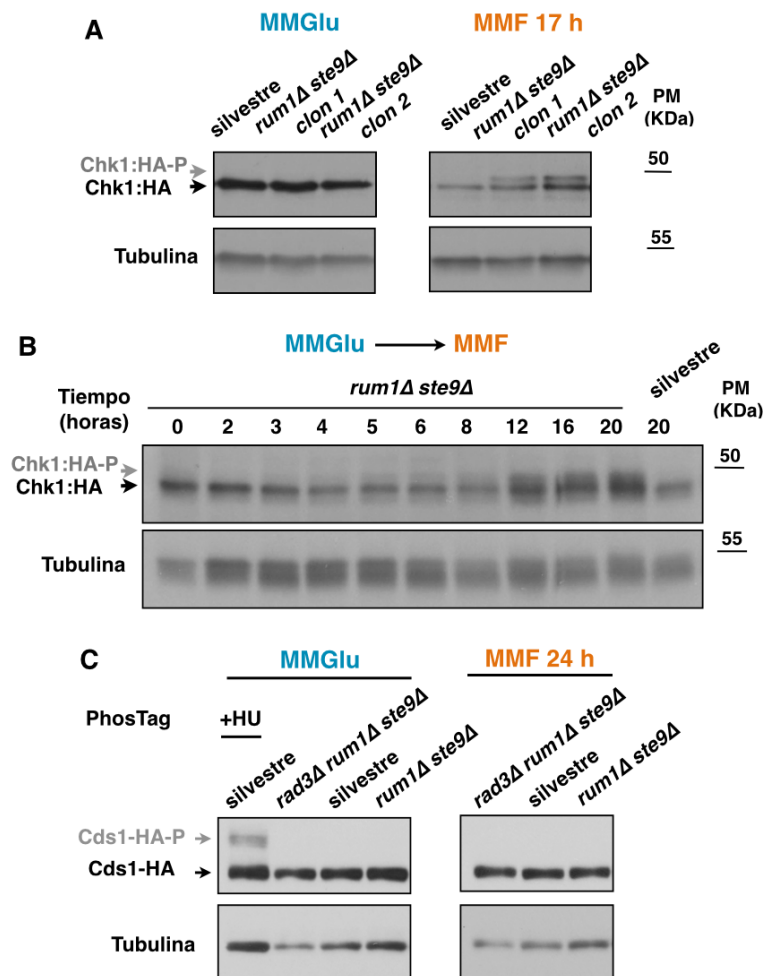


Figura 14. Chk1 se activa en el mutante *rum1Δ ste9Δ*. **A.** *Western blot* de la activación de Chk1-HA en dos clones de la cepa *rum1Δ ste9Δ* en MMF. **B.** *Western blot* de la activación de Chk1-HA a tiempos cortos tras un cambio de MMGlu a MMF en el mutante *rum1Δ ste9Δ*. **C.** *Western blot* de gel Phos-tag para visualizar la fosforilación de Cds1-HA. No se detecta fosforilación de Cds1 en el mutante *rum1Δ ste9Δ*.

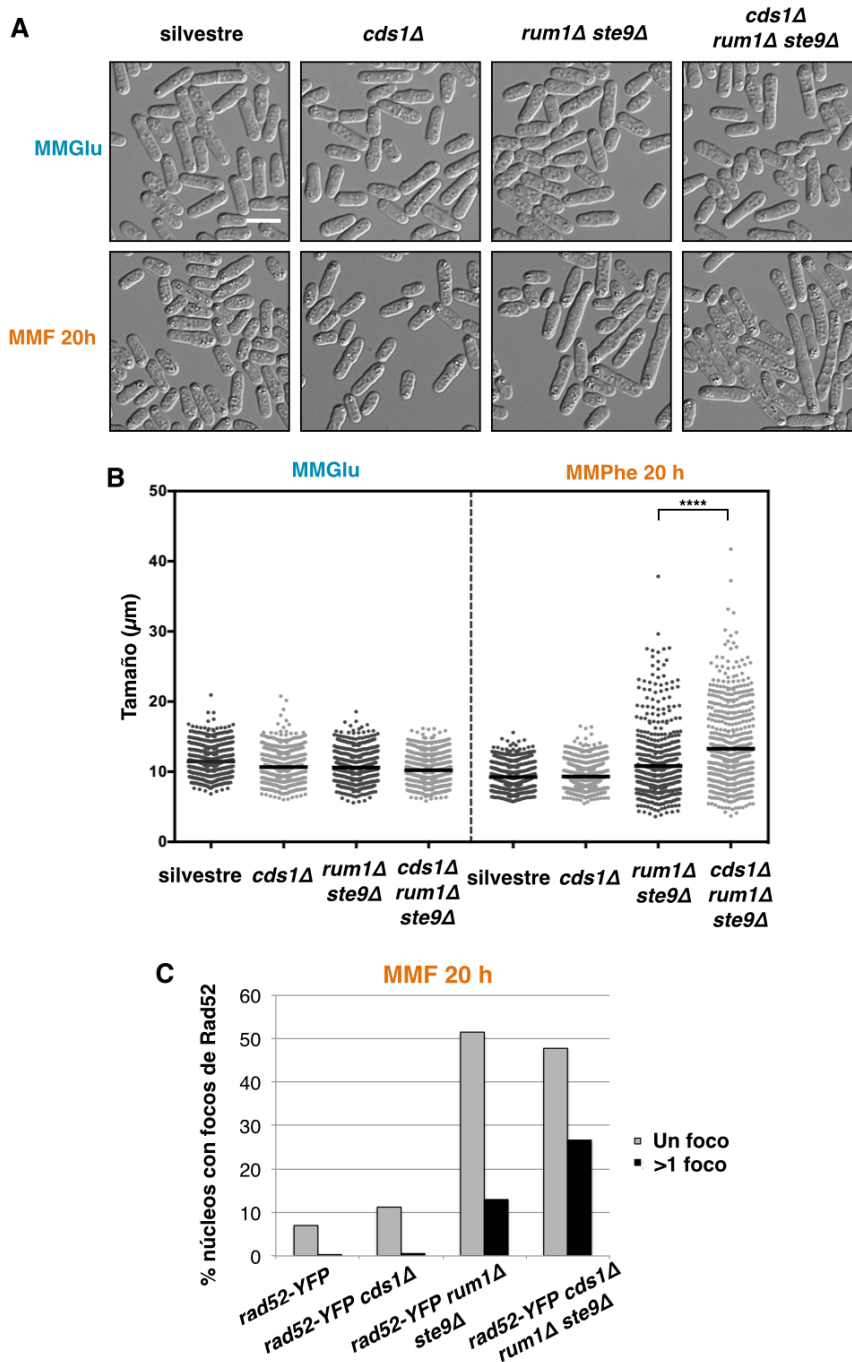


Figura 15. La pérdida de *cds1*⁺ en el mutante *rum1Δ ste9Δ* incrementa el daño en el DNA. A. Imágenes representativas DIC de los cultivos *in vivo*. Escala de 10 μ m. **B.** Representación del tamaño de 600 células en cultivo *in vivo* medidas sobre imágenes de microscopía de una tinción con Blankophor. La barra representa la media. (**** $p < 0,0001$). **C.** Cuantificación en 500-520 células de los porcentajes de núcleos con uno o más de un foco de Rad52 de un solo experimento. El mutante *cds1Δ rum1Δ ste9Δ* presenta más células con más de un foco que el mutante *rum1Δ ste9Δ*.

Sin embargo, el triple mutante *cds1Δ rum1Δ ste9Δ* presentó un mayor número de células alargadas y bloqueadas en G2 (**Figura 15A y B**). Así como mayor número de células con más de un foco con respecto al mutante *rum1Δ ste9Δ* (**Figura 15C**). Este resultado indica que aunque no se haya detectado la fosforilación de Cds1-HA, la inactivación del *checkpoint* de fase S incrementa el daño endógeno en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF.

En conjunto, estos resultados sugieren que en células carentes de *rum1⁺* y de *ste9⁺* en MMF se produce la activación de ambos *checkpoints* de integridad del DNA. Además, el fenotipo de catástrofe mitótica del triple mutante *rad3Δ rum1Δ ste9Δ* parece deberse a la falta de ambos *checkpoints*, dado que el fenotipo es diferente del de *chk1Δ rum1Δ ste9Δ*. Probablemente, la activación de Cds1 sea anterior a la de Chk1 y transitoria. La activación de Chk1, que coincide con el momento en que empiezan a aumentar los focos de Rad52-YFP, provocaría una parada del ciclo celular en G2 y el alargamiento de las células antes de entrar en mitosis y dividirse.

7. El efecto del cambio de la distribución de las fases del ciclo en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF

En nuestro laboratorio se ha descrito que la ruta de Ppk18-Igo1 es la principal responsable de la aceleración de la entrada en mitosis cuando se produce el cambio de medio de MMGlu a MMF (Chica *et al.* 2016). Igo1 inhibe a la fosfatasa PP2A-Pab1, lo que reduce el umbral que debe alcanzar la actividad CDK para entrar en mitosis. Como consecuencia, las células reducen su tamaño y tienen una fase G2 más corta en este medio (Chica *et al.*, 2016).

El mutante *rum1Δ ste9Δ* también reduce su tamaño tras el cambio de medio a MMF, lo que indica que este mutante es capaz de activar la ruta Ppk18-Igo1 con normalidad. Sin embargo, en este mutante no se produce la extensión de la fase G1 que ocurre en la cepa silvestre. Para determinar si este defecto es la primera causa de daño endógeno en el mutante, se analizaron mediante diferentes abordajes si alteraciones en la distribución de las fases del ciclo podían rescatar o empeorar el fenotipo.

7.1. Reducción de la actividad CDK en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF

Rum1 y Ste9 son dos reguladores negativos de la transición G1/S porque reducen la actividad de Cdc2. Para establecer si el aumento de actividad CDK en el mutante *rum1Δ ste9Δ* es la principal causa de inestabilidad genómica, combinamos el doble mutante con el alelo *cdc2-asM17*. Este mutante de Cdc2 es sensible a análogos de ATP (*as*, del inglés *analogue sensitive*). Además, lleva una mutación adicional M17, que rescata la sensibilidad de *cdc2-as* a altas y bajas temperaturas, así como defectos meióticos (Aoi *et al.*, 2014).

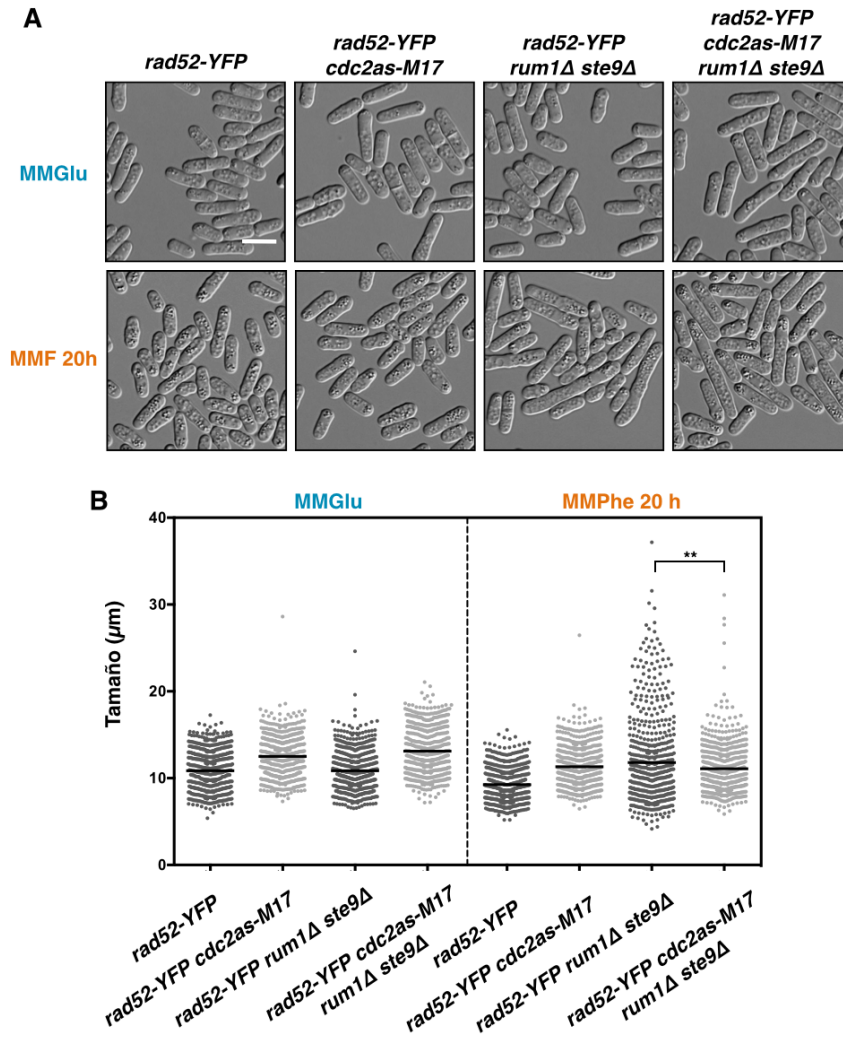


Figura 16. La bajada de actividad de Cdc2 rescata el fenotipo de células alargadas del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF. A. Imágenes representativas DIC de los cultivos *in vivo*. Escala de 10 μm . **B.** Representación del tamaño de 600 células en cultivo *in vivo* medidas sobre imágenes de microscopía de una tinción con Blankophor. La barra representa la media. (** $p < 0,01$).

En este experimento se utilizaron cepas con Rad52-YFP para cuantificar los focos de daño. Se observó que las células del mutante *rad52-YFP cdc2-asM17* en ausencia de inhibidores análogos de ATP, presentaban un tamaño ligeramente mayor en MMGlu y MMF que la cepa *rad52-YFP* (**Figura 16**).

Este fenotipo es consistente con una ligera reducción de la actividad de Cdc2 debido a que *cdc2-asM17* es un alelo hipomorfo de *cdc2⁺* en ausencia de inhibidores. El mutante *rad52-YFP cdc2-asM17 rum1Δ ste9Δ* mostró un menor número de células alargadas (**Figura 16A y B**) y de núcleos con focos de daño (**Figura 17**).

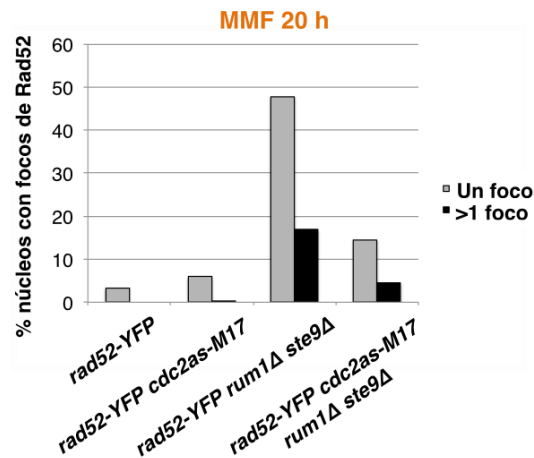


Figura 17. La bajada de actividad de Cdc2 en el mutante *rum1Δ ste9Δ* rescata el fenotipo de daño en MMF. Cuantificación en 500-520 células de los porcentajes de núcleos con uno o más de un foco de Rad52-YFP de un solo experimento.

Además, posiblemente el mutante *rad52-YFP cdc2-asM17* alargue principalmente la fase G2 del ciclo celular ya que presentó células de mayor tamaño y el umbral de actividad CDK para entrar en mitosis es más alto que para hacer fase S. Sin embargo, el mutante *rad52-YFP cdc2-asM17* presentó un pico 1C de contenido de DNA mayor que la cepa silvestre a las 6 horas tras el cambio de medio. Esto podría deberse a que solo durante el primer ciclo sí se detecte una extensión de la fase G1 (**Figura 18**).

Como se puede observar en los histogramas de contenido de DNA (**Figura 18**) el mutante *rad52-YFP cdc2-asM17 rum1Δ ste9Δ* no mostró ningún pico 1C en MMF, lo que sería consistente con células que tienen una fase G2 más larga y no necesitan extender la fase G1.

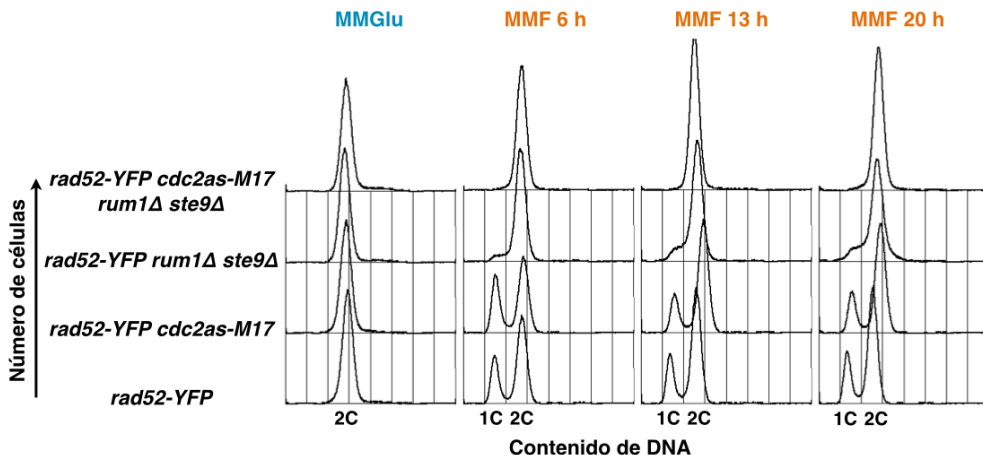


Figura 18. El mutante *cdc2as-M17* alarga la fase G2 y reduce la población de células en G1/S del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF. Histogramas de citometría de flujo del contenido de DNA. El mutante *rad52-YFP cdc2-asM17* presentó una mayor población de células en G1 que la cepa *rad52-YFP* en MMF tras 6 horas por una extensión de la fase G1 y luego esta población se reduce tras 13 y 20 horas como consecuencia del alargamiento de la fase G2.

Estos resultados permiten concluir que una menor actividad de Cdc2 en el mutante *rad52-YFP rum1Δ ste9Δ* rescata el fenotipo de inestabilidad genómica en MMF. Probablemente, se deba a un efecto del alargamiento de la fase G2, de forma similar a lo que ocurre cuando las células crecen en medios ricos.

7.2. Incremento y reducción de la actividad PP2A en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF

La entrada en mitosis está definida por el balance entre la actividad del complejo Cdk1-ciclina B y la actividad fosfatasa del complejo PP2A-B55, que inhibe la activación de Cdk1-ciclina B y antagoniza la fosforilación de sus sustratos (Mochida, 2016). En la levadura de fisión, la actividad PP2A-B55 está formada mayoritariamente por el complejo PP2A-Pab1. En medios pobres, la ruta Ppk18-Igo1 se encarga de inhibir PP2A-Pab1 para permitir la entrada en mitosis a un menor tamaño celular. Por tanto, células que carecen del inhibidor *igo1⁺* presentan un retraso en G2, mientras que células delecionadas para *ppa2⁺*, una de las dos subunidades catalíticas de PP2A, tienen una entrada acelerada en mitosis (Chica *et al.*, 2016).

Con objeto de estudiar si una mayor o menor actividad de la fosfatasa PP2A podría rescatar o empeorar, respectivamente, el fenotipo de *rum1Δ ste9Δ* en MMF, se construyeron los mutantes *igo1Δ rum1Δ ste9Δ* y *ppa2Δ rum1Δ ste9Δ*. Por un lado, las células delecionadas para *igo1⁺* mostraron un fenotipo de células largas a consecuencia de un retraso de la entrada en mitosis. Las células del mutante triple *igo1Δ rum1Δ ste9Δ* presentaron un fenotipo similar a *igo1Δ*. Es decir, que la deleción de *igo1⁺* rescata el fenotipo de células alargadas y de focos de daño en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF (**Figuras 19 y 20**).

Mediante citometría de flujo se observó que tanto el mutante *igo1Δ* como *igo1Δ rum1Δ ste9Δ* no presentaban pico 1C de contenido de DNA debido a que la fase G2 es larga y no extienden la fase G1 (**Figura 21**). Además, la división se produce a un tamaño celular más grande (**Figura 19**). Esta situación recuerda de nuevo al crecimiento en medios ricos, donde la fase G2 es larga y las células se dividen con un tamaño celular mayor.

El mutante *ppa2Δ* presentó células de menor tamaño como ya había sido descrito anteriormente, debido a un acortamiento de la fase G2 (Chica *et al.*, 2016). El triple mutante *ppa2Δ rum1Δ ste9Δ* mostró un fenotipo similar a *rum1Δ ste9Δ*, aunque con un mayor número de células alargadas, pero que no alcanzaban tamaños tan altos como en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* (**Figura 19**). Además, el porcentaje de núcleos con focos de Rad52-YFP era ligeramente más bajo en el triple mutante *ppa2Δ rum1Δ ste9Δ* con respecto a *rum1Δ ste9Δ* (**Figura 20**).

Por otra parte, se observó que el mutante *ppa2Δ* presentó un pico 1C de contenido de DNA más alto como consecuencia de la reducción de la fase G2 y la división a un menor tamaño celular en los histogramas de citometría de flujo (**Figura 21**). El triple mutante *ppa2Δ rum1Δ ste9Δ* mostró un hombro entre los picos 1C y 2C de contenido de DNA más elevado que en el mutante *rum1Δ ste9Δ* (**Figura 21**).

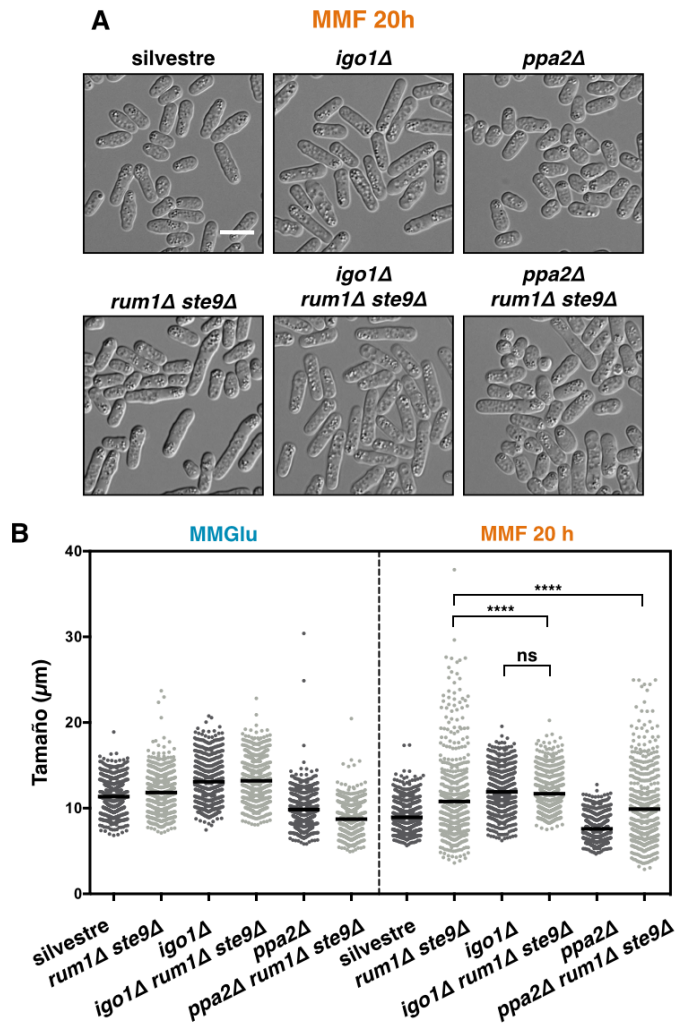


Figura 19. La delección de *igo1*⁺ en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF rescata el fenotipo de células alargadas y la de *ppa2*⁺ lo empeora. **A.** Imágenes representativas DIC de los cultivos *in vivo*. Escala de 10 μm. **B.** Representación del tamaño de 600 células en cultivo *in vivo* medidas sobre imágenes de microscopía de una tinción con Blankophor. La barra representa la media. (*****p* < 0,0001).

Por otra parte, se observó que el mutante *ppa2Δ* presentó un pico 1C de contenido de DNA más alto como consecuencia de la reducción de la fase G2 y la división a un menor tamaño celular en los histogramas de citometría de flujo (**Figura 21**). El triple mutante *ppa2Δ rum1Δ ste9Δ* mostró un hombro entre los picos 1C y 2C de contenido de DNA más elevado que en el mutante *rum1Δ ste9Δ* (**Figura 21**).

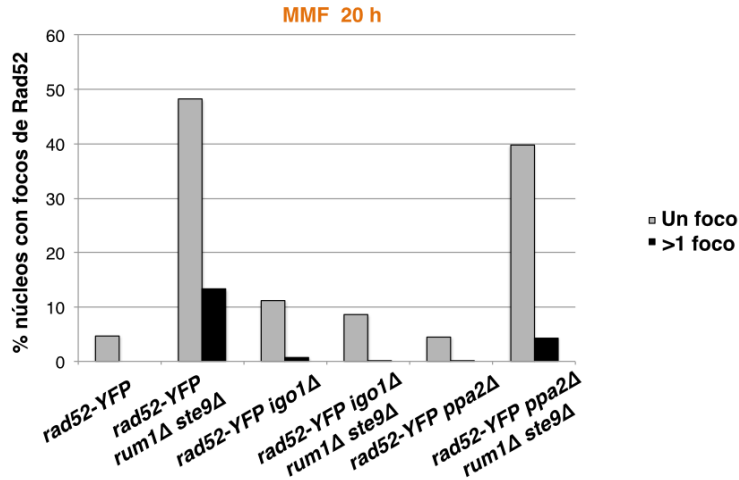


Figura 20. La delección de *igo1⁺* en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF rescata el fenotipo de daño. Cuantificación en 500-520 células de los porcentajes de núcleos con uno o más de un foco de Rad52-YFP.

Finalmente, cuando las células del triple mutante *ppa2Δ rum1Δ ste9Δ* en MMF se tiñeron con DAPI y Blankophor y se siguieron por microscopía, un significativo número de células presentaron fenotipo de catástrofe mitótica similar al mutante *rad3Δ rum1Δ ste9Δ*, aunque en menor medida (Figura 22, flechas). Este resultado sugiere que el complejo PP2A-Pab1 podría tener una función en el mantenimiento del bloqueo en G2 en células que tienen activo el *checkpoint* de daño en el DNA, bloqueando la actividad CDK y la entrada en mitosis. De acuerdo a esta idea, en extractos de huevos de *Xenopus laevis*, se ha descrito un aumento de la actividad de PP2A en presencia de daño en el DNA (Wang *et al.*, 2015). Además, esta posibilidad explicaría por qué las células del triple mutante *ppa2Δ rum1Δ ste9Δ* en MMF no se alargan tanto como las de la cepa *rum1Δ ste9Δ*.

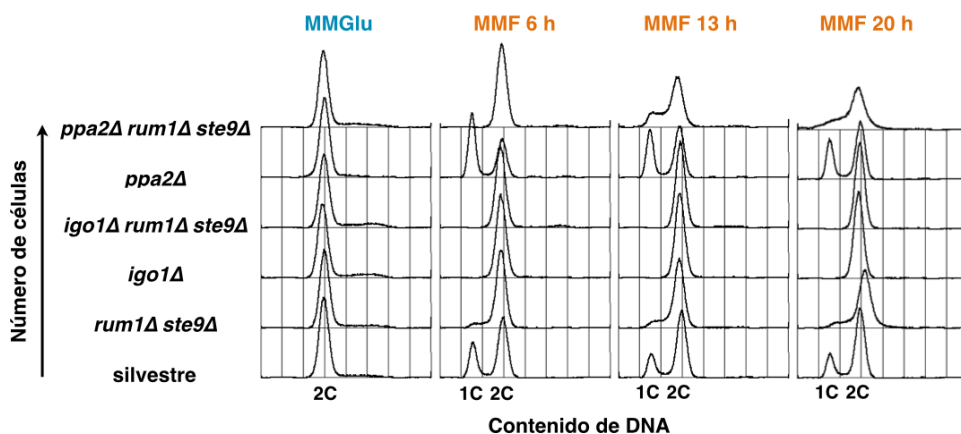


Figura 21. La delección de *igo1⁺* en el mutante *rum1Δ ste9Δ* alarga la fase G2 en MMF , mientras que la delección de *ppa2⁺* reduce la fase G2. Histogramas de citometría de flujo del contenido de DNA y tamaño celular.

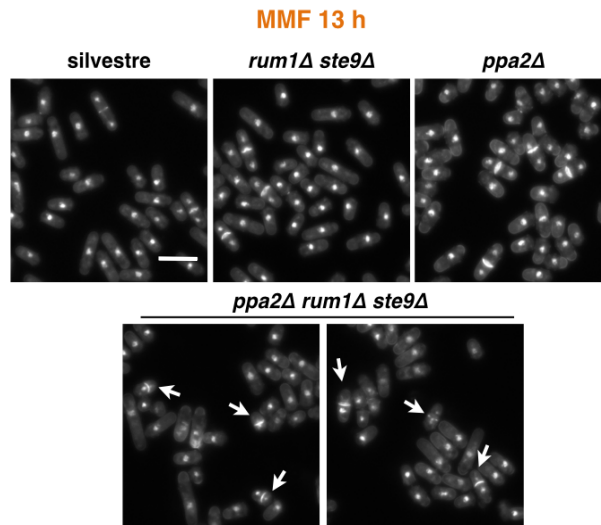


Figura 22. El triple mutante *ppa2Δ rum1Δ ste9Δ* presenta un fenotipo de catástrofe mitótica en MMF. Imágenes representativas de células fijadas y con doble tinción de DAPI y Blankophor. Las flechas señalan células con fenotipos de catástrofe mitótica. Escala de 10 μm .

En conjunto, estos datos muestran que la extensión de la fase G2, mediante la delección de *igo1⁺* en el mutante *rum1Δ ste9Δ*, en MMF rescata el fenotipo de daño en el DNA y de activación del *checkpoint* y bloqueo de células en G2. Este resultado es coherente con los datos mostrados del mutante *rad52-YFP cdc2-asM17 rum1Δ ste9Δ*.

Por el contrario, la reducción de la fase G2, mediante la delección de *ppa2⁺* en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF genera un empeoramiento del fenotipo. Además, es posible que PP2A juegue un papel en el mantenimiento del bloqueo en G2 tras la activación del *checkpoint*.

7.3. La delección de *igo1⁺* rescata el estrés replicativo que presentan las células del mutante *rum1Δ ste9Δ* en medios ricos

Los resultados anteriores sugieren que en MMF el mutante *rum1Δ ste9Δ* presenta estrés replicativo. Con objeto de determinar si este doble mutante es más sensible a estrés replicativo en medio rico se determinó la sensibilidad a hidroximetiluracilo (inhibidor de la síntesis de dNTPs) en medio YES. Para ello se realizó un ensayo de sensibilidad en gotas con estos mutantes en placas de cultivo con 5 mM HU.

Como se muestra en la **Figura 23**, el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* es ligeramente más sensible al tratamiento con HU 5 mM en medio rico que la cepa silvestre, lo cual sugiere que este mutante es sensible a estrés replicativo incluso en medio rico, donde no presenta fenotipo. No se pudo realizar el mismo tipo de ensayo en medio mínimo con cloruro amónico (MM) ni en MMF porque la HU no penetra en las células en estos medios.

Por otro lado, se observó que la delección de *igo1⁺* en el mutante *rum1Δ ste9Δ*

rescataba esta sensibilidad a HU. También mejoraba el leve retraso en el crecimiento que se observaba en el doble mutante en MMF como consecuencia del bloqueo de células en G2. Por el contrario, la delección de *ppa2⁺* en el mutante *rum1Δ ste9Δ* no afectó a la sensibilidad mostrada en HU 5mM. Sin embargo, sí se pudo apreciar un peor crecimiento en MMF (**Figura 23**). De esta manera, estos resultados corroboran los datos comentados anteriormente sobre los fenotipos de *igo1Δ rum1Δ ste9Δ* y *ppa2Δ rum1Δ ste9Δ*.

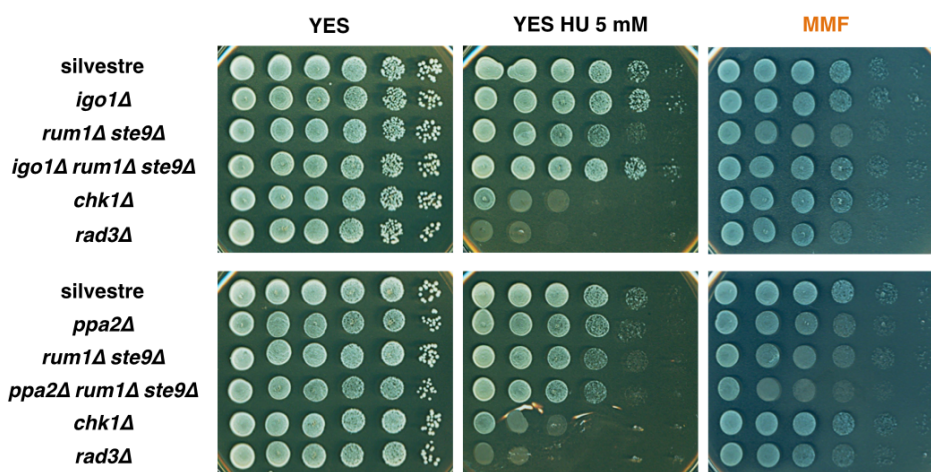


Figura 23. La delección de *igo1⁺* rescata la sensibilidad a HU del mutante *rum1Δ ste9Δ* en YES, mientras que la delección de *ppa2⁺* empeora su crecimiento en placas de MMF. Ensayo de gotas con diluciones seriadas de las diferentes cepas tras crecerlas en cultivo líquido en medio rico MMGlu, en placas de YES, YES con HU 5 mM y MMF durante 3 días a 32°C.

7.4. La delección de *cig2⁺* empeora el fenotipo del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF

Cig2 es la ciclina que junto con Cdc13 se asocia a Cdc2 para promover la transición G1/S en combinación con Cdc2. Su expresión aumenta al final de la fase G1 y disminuye tras la fase S. El complejo Cdc2-Cig2 es inhibido directamente por Rum1 y la degradación de Cig2 es promovida por el complejo APC/C-Ste9 (Yamano, 2004; Martin-Castellanos *et al.*, 1996; Benito *et al.*, 1998). Además, la delección de *cig2⁺* genera células con una fase G1 más larga, que se bloquean antes en G1 en medio mínimo sin nitrógeno y son hiperfértiles (Obara-Ishibara y Okayama, 1994).

Para estudiar si un aumento de la fase G1 en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF podría ser beneficioso para las células, se delecionó *cig2⁺* en este doble mutante. Al contrario de lo esperado, las células del triple mutante *cig2Δ rum1Δ ste9Δ* presentaron un porcentaje más alto de células alargadas en MMF (**Figura 24**).

Las células del triple mutante *cig2Δ rum1Δ ste9Δ* mostraban un elevado número de células en fase S (**Figura 25**). Estos datos sugieren que la delección de *cig2⁺* en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF genera células con una fase S más lenta, probablemente mayor daño en el DNA y más células bloqueadas por el *checkpoint*.

Todo ello supone un empeoramiento del fenotipo y pérdida de viabilidad.

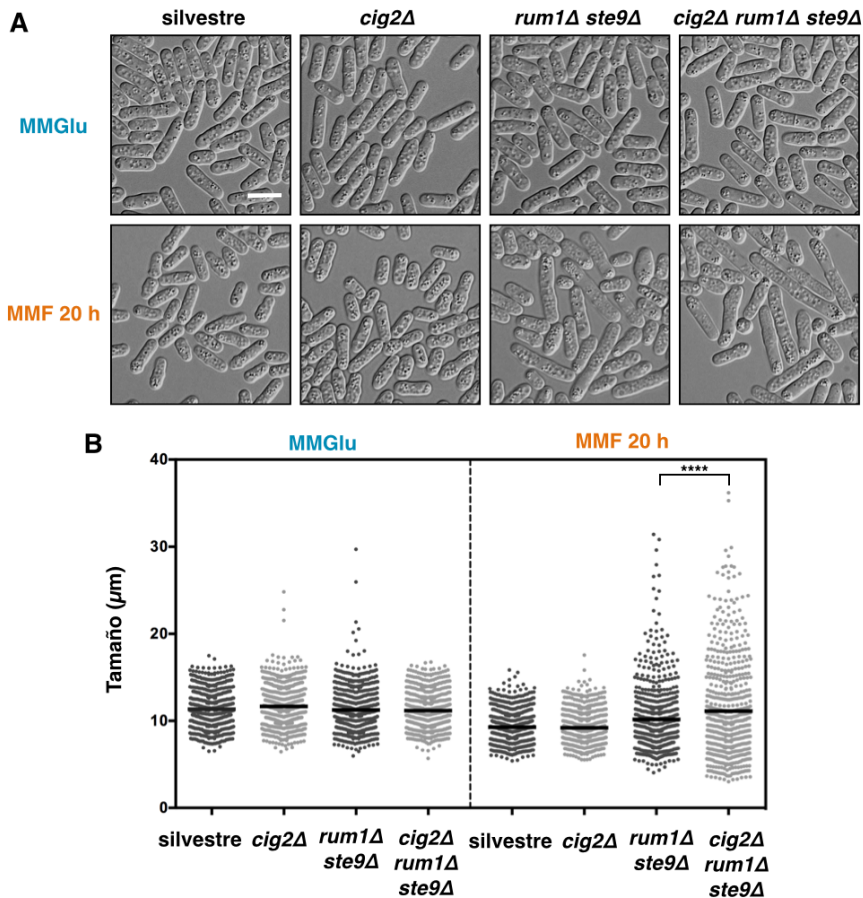


Figura 24. La delección de *cig2⁺* empeora el fenotipo del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF. **A.** Imágenes representativas DIC de los cultivos *in vivo*. Escala de 10 µm. **B.** Representación del tamaño de 600 células en cultivo *in vivo* medidas sobre imágenes de microscopía de una tinción con Blankophor. La barra representa la media. (**** $p < 0,0001$).

Una fracción de las células del triple mutante *cig2Δ rum1Δ ste9Δ* mostraban mayor población de células en G1/S y eran capaces de conjugarse. Sin embargo, los cigotos que se formaban eran aberrantes y las esporas inviables (**Figura 26**). Este rescate del fenotipo de esterilidad ya había sido descrito previamente también en el mutante *cig2Δ ste9Δ* (Kitamura *et al.*, 1998).

En conjunto, estos resultados indican que la delección de *cig2⁺* afecta negativamente al doble mutante *rum1Δ ste9Δ*. A pesar de que se extiende la fase G1 se observan más células en fase S entre los picos 1C y 2C de contenido de DNA, más estrés replicativo y más células alargadas por el *checkpoint*.

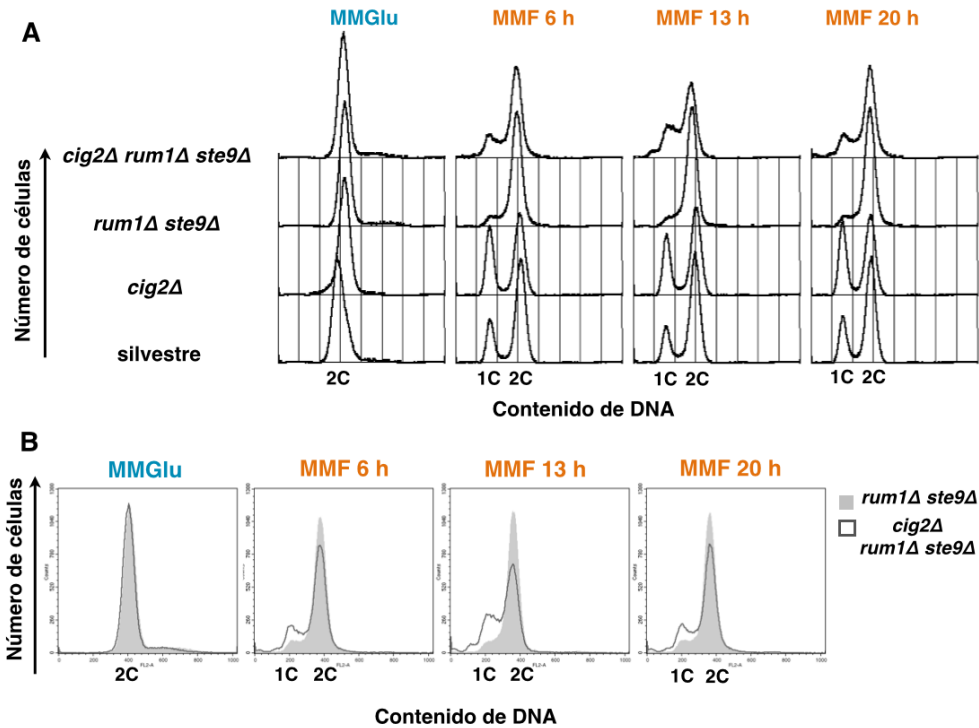


Figura 25. La delección de *cig2⁺* aumenta el número de células en G1-S en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF **A**. Histogramas de citometría de flujo del contenido de DNA. **B**. Histogramas de citometría de flujo superpuestos del contenido de DNA de los mutantes *cig2Δ rum1Δ ste9Δ* y *rum1Δ ste9Δ*.

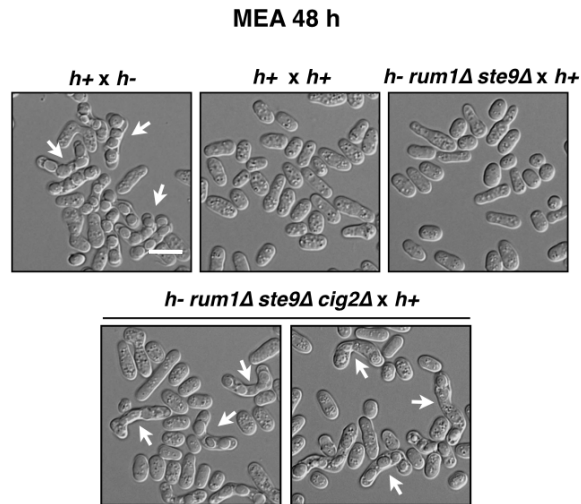


Figura 26. El triple mutante *cig2Δ rum1Δ ste9Δ* alarga la fase G1 y es capaz de **conjugar**. Imágenes representativas DIC de los cruces *in vivo* tras dos días creciendo en medio MEA. Las flechas señalan cigotos que en el caso del mutante *cig2Δ rum1Δ ste9Δ* son aberrantes. Escala de 10 μ m.

8. La delección de *spd1*⁺ alivia el fenotipo del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF

La regulación de la disponibilidad de dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato) durante el ciclo celular es muy importante en las células para mantener la integridad genómica. En la levadura de fisión, la proteína Spd1 inhibe el ensamblaje de la enzima RNR, encargada de la producción de dNTPs. Las células que carecen de *spd1*⁺ tienen un nivel de dNTPs endógeno más alto que la cepa silvestre (Holmberg, 2005). Spd1 es una proteína inestable que se degrada por la E3 ubiquitin ligasa CRL4^{Cdt2} al inicio de cada fase S y en situaciones de estrés replicativo (Liu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005). De esta forma, Spd1 regula negativamente la actividad de la enzima RNR durante el ciclo celular y aquellas cepas que no degradan Spd1 correctamente en la fase S, presentan una replicación más lenta y son sensibles a tratamientos que generan daño en el DNA. Por tanto, la acumulación de Spd1 genera estrés replicativo e inestabilidad genómica (Fleck *et al.*, 2013).

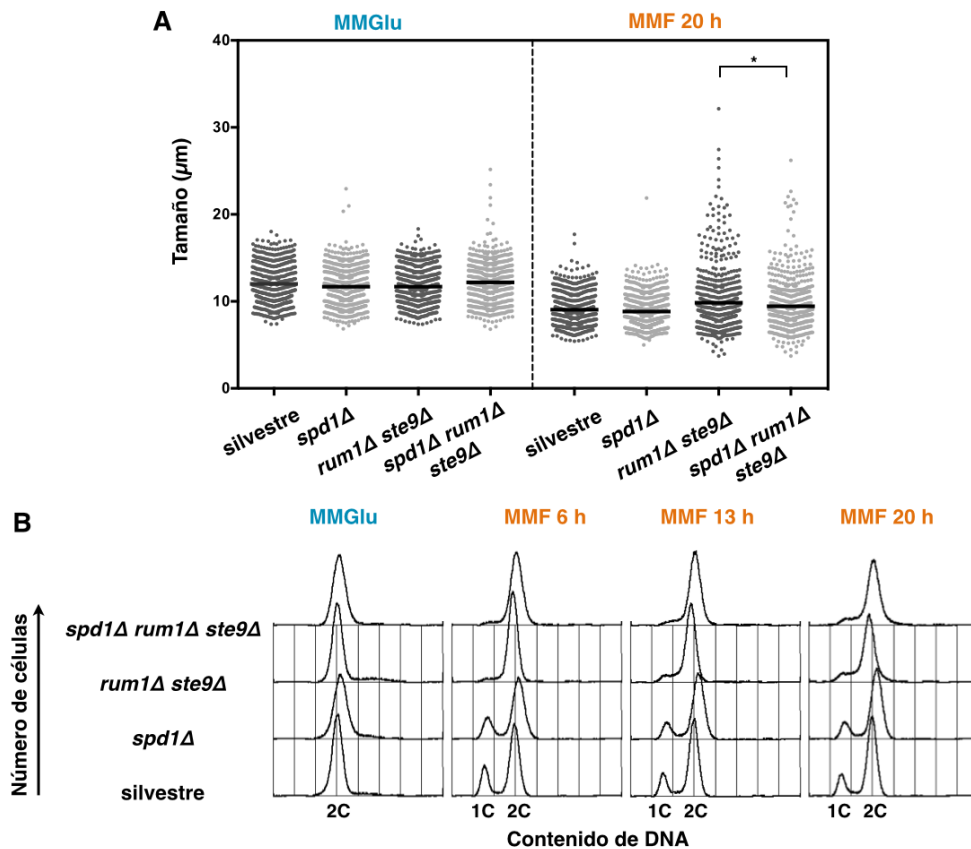


Figura 27. La delección de *spd1*⁺ en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF reduce el número de células alargadas. A. Representación del tamaño de 600 células en cultivo *in vivo* medidas sobre imágenes de microscopía de una tinción con Blankophor. La barra representa la media. (* $p < 0,05$). **B.** Histogramas de citometría de flujo del contenido de DNA.

Una hipótesis que consideramos es que el estrés replicativo y el daño de las células del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF se deba a que las células tengan un nivel de

dNTPs más bajo. Para comprobar esta hipótesis se construyó el mutante *spd1Δ rum1Δ ste9Δ* y se analizó el fenotipo en MMF. Se observó que las células de este triple mutante eran menos alargadas en MMF que las del doble mutante *rum1Δ ste9Δ* (**Figura 27A**). Además, los histogramas de citometría de flujo del triple mutante y del doble eran similares en el contenido de DNA (**Figura 27B**).

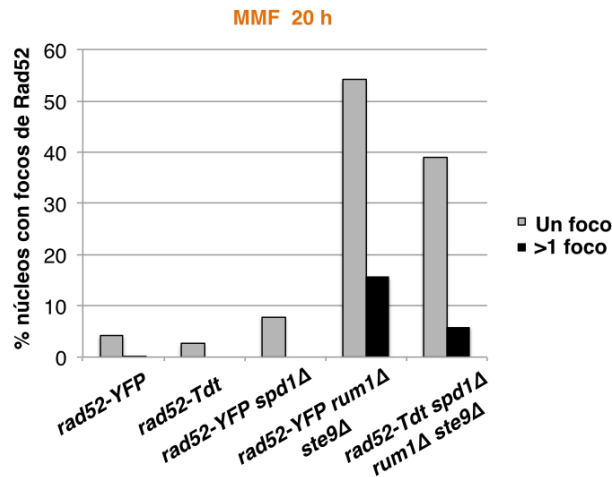


Figura 28. La delección de *spd1⁺* en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF reduce el número de focos de daño. Cuantificación en 500-520 células de los porcentajes de núcleos con uno o más de un foco de Rad52-YFP/Tdt.

En cuanto a los focos de Rad52-YFP de daño en el DNA, las células del triple mutante *spd1Δ rum1Δ ste9Δ* en MMF presentaron menor número de núcleos con focos respecto al doble mutante *rum1Δ ste9Δ* (**Figura 28**). Por tanto, la delección de *spd1⁺* disminuye el daño endógeno en el DNA en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF.

Además, se observó mediante ensayo de gotas en placas que la delección de *spd1⁺* también mejoraba de una forma más evidente el defecto de crecimiento en MMF del triple mutante *rad3Δ rum1Δ ste9Δ* y que, por tanto, la delección de *spd1⁺* rescataba parcialmente el fenotipo de daño (**Figura 29**).

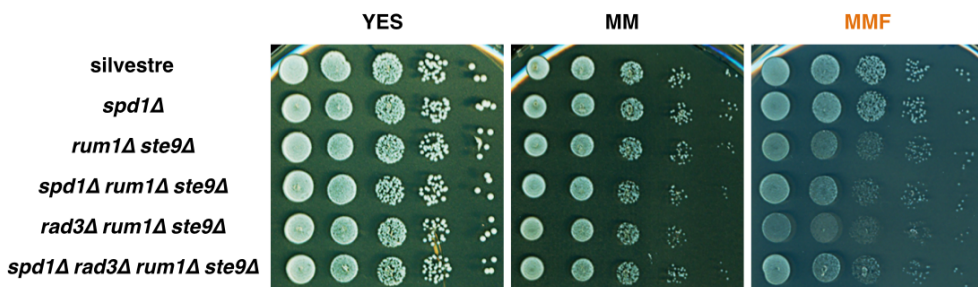


Figura 29. La delección de *spd1⁺* mejora ligeramente el crecimiento en placas de MMF del mutante *rad3Δ rum1Δ ste9Δ*. Ensayo de gotas con diluciones seriadas de cultivos de las distintas cepas en placas de YES, MM y MMF, que se crecieron durante 3-4 días a 32°C.

En definitiva, es posible que el estrés replicativo del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF tenga como origen la escasez de dNTPs debido a una reducción en los niveles de la enzima RNR o a una falta de degradación de Spd1.

9. La transcripción dependiente de MBF es más baja en el mutante *rum1Δ ste9Δ*

Al final de la fase G1 las células necesitan las actividades de Cdc2 y del factor de transcripción MBF, el ortólogo funcional de E2F en mamíferos, para realizar la transición G1/S. El complejo MBF controla la expresión de genes necesarios para la replicación del DNA, la síntesis de dNTPs y la regulación de la fase S (Bähler, 2005).

Entre los genes regulados por MBF, se encuentra el gen *tos4⁺* (SPAP14E8.02) cuya expresión aumenta en respuesta al tratamiento con HU (Rustici *et al.*, 2004). La proteína Tos4 fusionada a GFP ha sido utilizada para monitorizar la fase S y la expresión de genes dependientes de MBF. Las células que expresan Tos4-GFP mostraron un tamaño, tiempo de generación y contenido de DNA similar a la cepa silvestre (Kiang *et al.*, 2009).

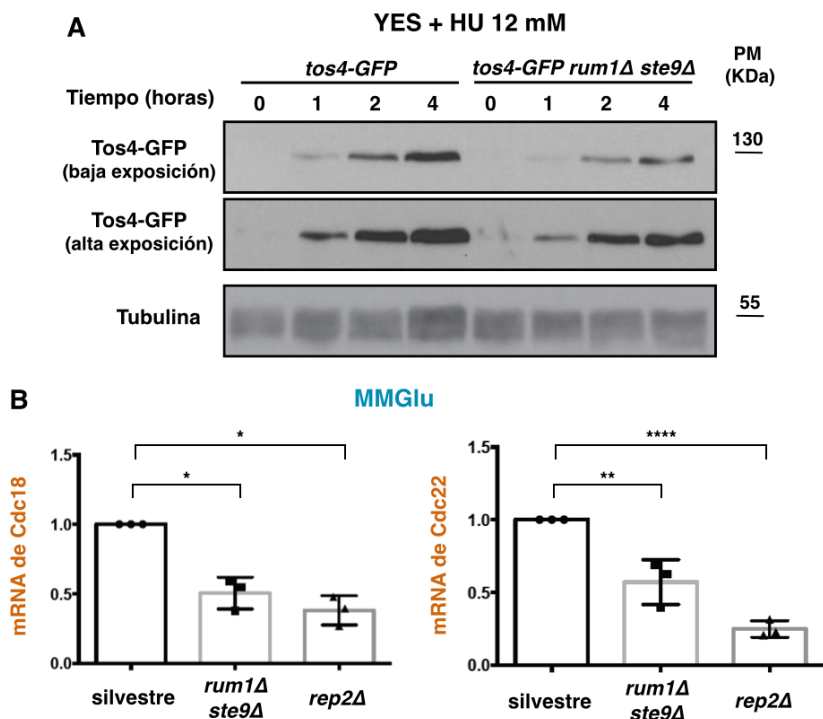


Figura 30. El mutante *rum1Δ ste9Δ* tiene menor actividad de MBF en medios ricos. A. Western blot de la cantidad de Tos4-GFP en el mutante *rum1Δ ste9Δ* y en la cepa silvestre tras inducción de estrés replicativo con HU 12 mM. **B.** Media de los niveles de mRNA de *cdc18⁺* y *cdc22⁺* en MMGlu en las cepas *rum1Δ ste9Δ*, *rep2Δ* y silvestre obtenidos a partir de tres repeticiones experimentales por RT-PCR. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$).

Debido a que el mutante *rum1Δ ste9Δ* presenta una fase G1 aberrante con mayores niveles de actividad CDK, es posible que la actividad de MBF se encuentre también desregulada. Para estudiar la actividad de MBF utilizamos cepas que expresen Tos4-GFP, lo cual nos permitió hacer ensayos de *western blot* y de microscopía. Tras una inducción de MBF en respuesta a estrés replicativo inducido por HU 12 mM en medio rico, se observó que los niveles de Tos4-GFP por *western blot* eran ligeramente más bajos en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* que en la cepa silvestre (**Figura 30A**).

Además, se realizaron RT-PCRs para determinar los niveles de RNA mensajero de otras dianas de MBF bien conocidas, como *cdc18⁺* y *cdc22⁺* en medio rico MMGlu. El mutante *rum1Δ ste9Δ* mostró niveles más bajos de ambos transcritos que la cepa silvestre, aunque no tan bajos como los del mutante *rep2Δ* (**Figura 30B**). Rep2 es un activador transcripcional de MBF y las células que carecen de *rep2⁺* tienen unos niveles reducidos de transcripción dependiente de MBF (Baum *et al.*, 1997; Nakashima *et al.*, 1995). **Estos resultados indican que el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* tiene menor actividad de MBF en medios ricos que la cepa silvestre.**

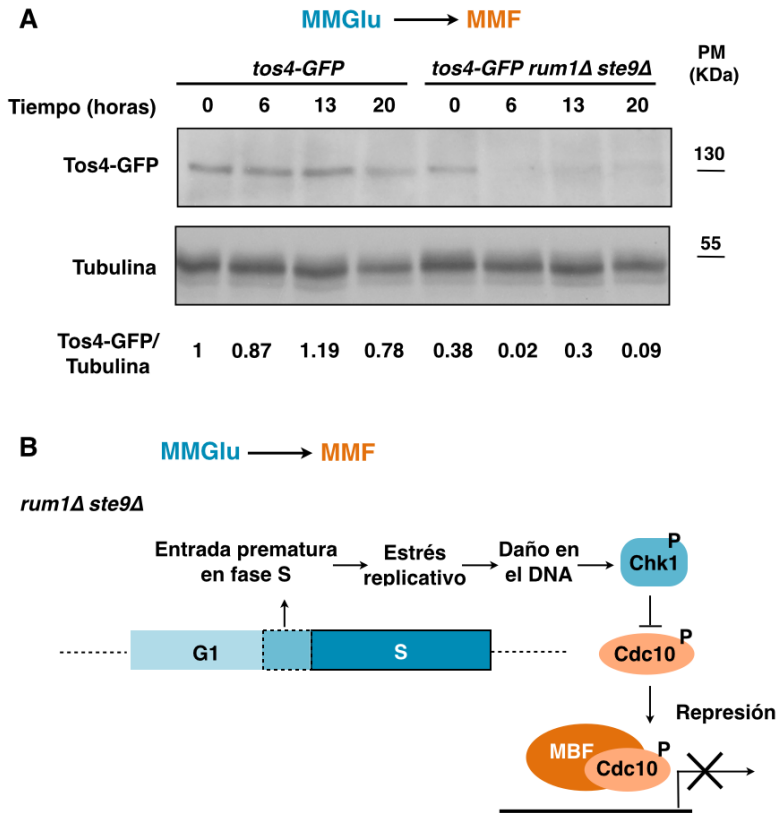


Figura 31. El mutante *rum1Δ ste9Δ* tiene menor actividad de MBF que la cepa silvestre en MMF. A. *Western blot* de la cantidad de Tos4-GFP en el mutante *rum1Δ ste9Δ* y en la cepa silvestre a 6, 13 y 20 horas tras el cambio de medio de MMGlu a MMF. **B.** Modelo de la activación de Chk1 y de la represión de la transcripción dependiente de MBF en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ*.

Por otra parte, se estudiaron los niveles de Tos4-GFP tras el cambio de medio de MMGlu a MMF. Mediante *western blot* se observó nuevamente que en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* los niveles de Tos4 en MMGlu eran ligeramente más bajos que en la cepa silvestre, pero que caían drásticamente a las 6, 13 y 20 horas en MMF (**Figura 31A**). La bajada de los niveles de Tos4-GFP tras el cambio a MMF se puede explicar en parte por la activación de Chk1, dado que la activación del *checkpoint* de daño en G2 reprime la expresión de algunas dianas de MBF (Ivanova *et al.*, 2013; **Figura 31B**). Como ya se había mencionado anteriormente, la activación de esta quinasa se produce durante el primer ciclo, aproximadamente a las 5 horas tras el cambio de medio, en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ*.

De igual manera, se analizó la intensidad de la fluorescencia de Tos4-GFP por microscopía a tiempos cortos de 3 y 4 horas, donde Chk1 aún no está fosforilado y el cultivo se encuentra parcialmente sincronizado. La señal nuclear de Tos4-GFP era menos intensa en el mutante que en la cepa silvestre y también era menor el número de células positivas para GFP (**Figura 32 y 33**).

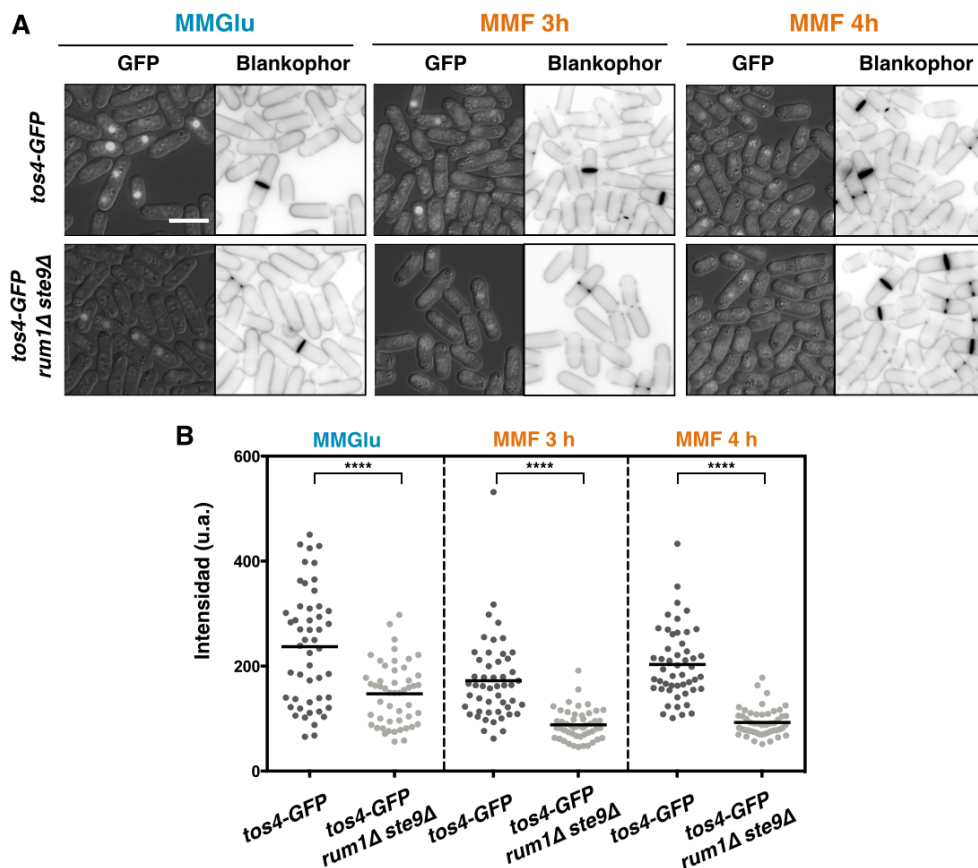


Figura 32. El mutante *rum1Δ ste9Δ* tiene menor intensidad de Tos4-GFP que la cepa silvestre en MMF. A. Imágenes representativas de la fluorescencia de Tos4-GFP y tinción con Blankophor en el mutante *rum1Δ ste9Δ* y en la cepa silvestre. **B.** Representación de la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (u.a.) de Tos4-GFP en 50 células cuantificadas en fotos de un solo plano en z. (**** $p < 0,0001$).

Como se describió anteriormente, al transferir las células de MMGlu a MMF el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* presenta una entrada prematura en fase S. Para determinar si la actividad de MBF estaba desregulada en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ*, se contaron de las células GFP positivas, el porcentaje de células que se encontraban unidas o separadas tras la septación, tanto en la cepa silvestre como en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ*. Se observó que el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* presentaba porcentajes más altos de células positivas para Tos4-GFP que estaban unidas tras la septación (**Figura 33**). Es importante reseñar que se contaron también los porcentajes totales de células con septo en el doble mutante y que, aunque fueron más altos en el doble mutante que en la cepa silvestre, no eran tan altos como para explicar la diferencia observada en el porcentaje de células Tos4-GFP positivas.

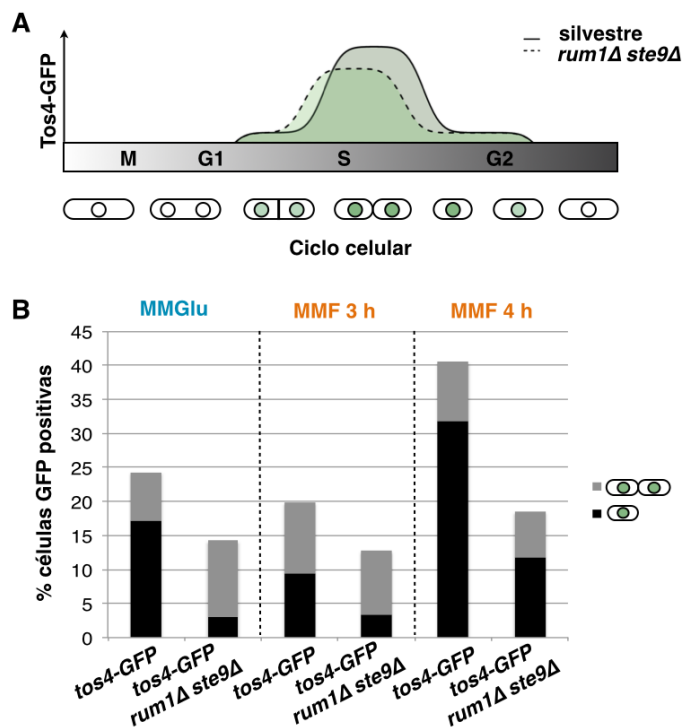


Figura 33. El mutante *rum1Δ ste9Δ* activa prematuramente MBF en MMF. A. Modelo de activación prematura de MBF en el mutante *rum1Δ ste9Δ*. **B.** Cuantificación de células Tos4-GFP positivas, y de éstas, aquellas que se encuentran aún septando (gris) o ya separadas (negro).

Teniendo en cuenta estos resultados, el doble mutante presenta niveles más bajos de actividad MBF en medios ricos donde el *checkpoint* de daño en el DNA no está activo. Por tanto, **MBF parece activarse prematuramente en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ***, quizás generando una entrada prematura en fase S. Además, cuando el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* crece en MMF y se activa Chk1, se reprime aún más la transcripción dependiente de MBF.

10. Baja actividad transcripcional dependiente de MBF en medio pobre causa inestabilidad genómica

Nrm1 y Yox1 son dos reguladores negativos de MBF y, por tanto, las células que carecen de *nrm1*⁺ o *yox1*⁺ presentan una activación constitutiva de la transcripción dependiente de MBF. Ambos mutantes presentan células más largas que una cepa silvestre y fenotipos de inestabilidad genómica en los medios ricos habitualmente usados en los laboratorios (Gómez-Escoda *et al.*, 2011; Caetano *et al.*, 2014).

El doble mutante *rum1Δ ste9Δ* presenta una desregulación de la actividad de MBF. Para saber si este efecto por sí genera inestabilidad genómica en MMF, se compararon los fenotipos de los mutantes *rum1Δ ste9Δ*, *rep2Δ* y *nrm1Δ*. Estos dos últimos presentan una menor y mayor actividad de MBF, respectivamente.

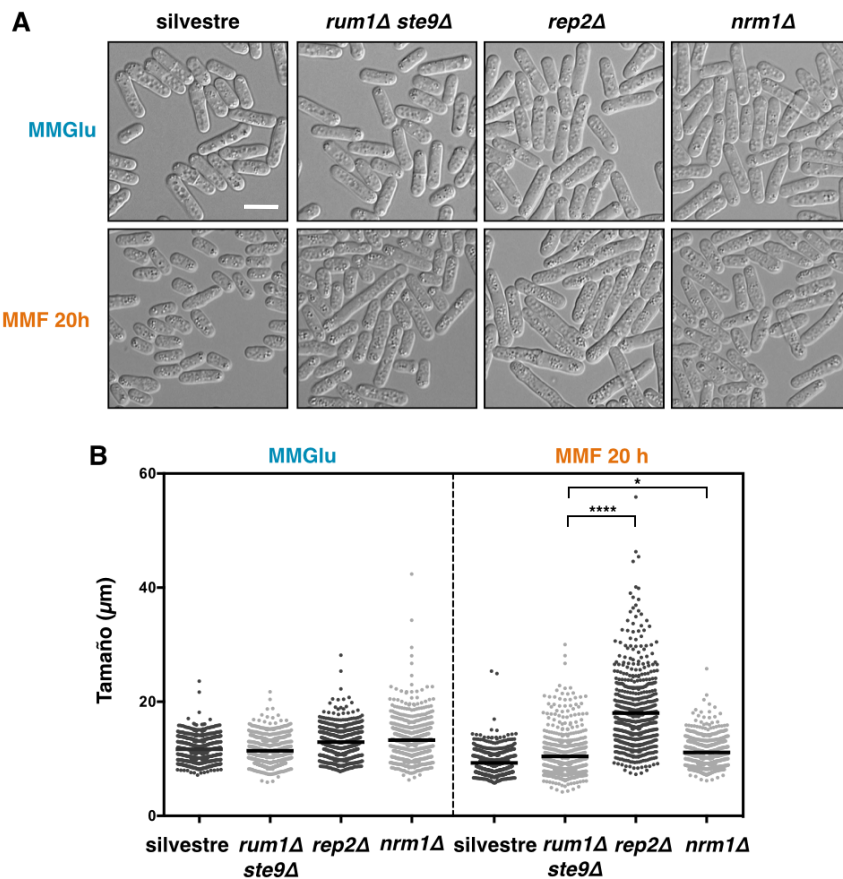


Figura 34. El mutante *rep2Δ* también presenta células largas en MMF. A. Imágenes representativas DIC de los cultivos *in vivo*. Escala de 10 μm. **B.** Representación del tamaño de 600 células en cultivo *in vivo* medidas sobre imágenes de microscopía de una tinción con Blankophor. El mutante *nrm1Δ* presenta algunas células alargadas en MMGlu, mientras que el mutante *rep2Δ* muestra numerosas células alargadas en MMF, al igual que el mutante *rum1Δ ste9Δ*. La barra representa la media. (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$).

Se observó que las células que carecían de *rep2*⁺ o *nrm1*⁺ tenían un tamaño mayor

en MMGlu (**Figura 34**). El mutante *nrm1Δ* tenía también algunas células muy alargadas, lo que sugiere una probable activación del *checkpoint* de daño en el DNA (**Figura 34B**). En MMF, las células del mutante *rep2Δ* presentaron un tamaño general muy grande y una subpoblación de células más alargadas que se generan probablemente por la activación de Chk1 (**Figura 34**). Este resultado indica que el fenotipo de *rep2Δ* en MMF es similar al del doble mutante *rum1Δ ste9Δ*, ambos con una menor actividad de MBF. En medio rico, ambos mutantes *rep2Δ* y *nrm1Δ* tienen un tamaño similar y mayor que la cepa silvestre o el mutante *rum1Δ ste9Δ* (**Figura 34**).

En cuanto a los histogramas de contenido de DNA, las células que carecen de *nrm1⁺* presentaron un solo pico 2C en todas las condiciones analizadas y ligeramente desplazado a la derecha. Esto se debe probablemente a que posee una fase G2 más larga (Caetano *et al.*, 2014). Por otra parte, el mutante *rep2Δ* mostró un histograma con un pico 1C mayor que en la cepa silvestre y visible incluso en YES, lo que revela un retraso en la transición G1/S (**Figura 35**).

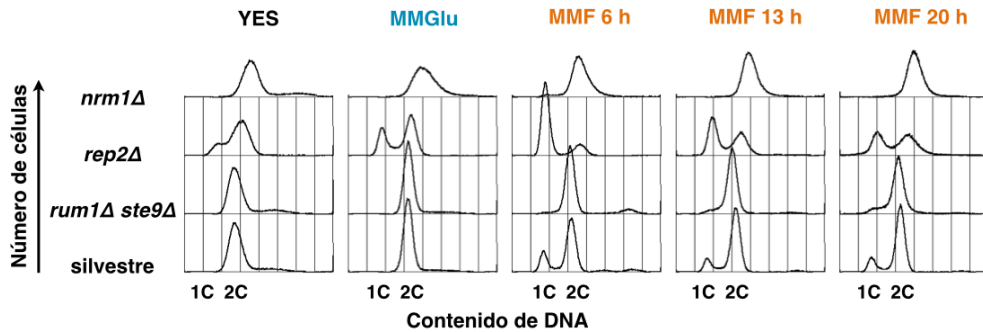


Figura 35. El mutante *rep2Δ* presenta un retraso en G1/S y *nrm1Δ* en G2/M. Histogramas de citometría de flujo del contenido de DNA.

Se midieron los porcentajes de núcleos con focos de Rad52-YFP para determinar si el fenotipo de las células alargadas era consistente con mayor daño en el DNA. En MMGlu, el mutante *nrm1Δ* presentó un porcentaje de núcleos con focos de Rad52-YFP más alto que las demás estirpes, mientras que en MMF el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* seguido de *rep2Δ* mostraron niveles muy altos de daño endógeno (**Figura 36**). Estos datos sugieren que la desregulación de la actividad de MBF genera fenotipos de inestabilidad genómica. Sin embargo, en MMF parece especialmente relevante que las células tengan unos niveles mínimos de transcripción dependiente de MBF.

Esto sugiere que el factor de transcripción MBF también controla la distribución de las fases del ciclo y que los mutantes *rep2Δ* y *nrm1Δ* tienen un mayor tamaño debido a un retraso en las transiciones G1/S y G2/M, respectivamente. En las células que carecen de *nrm1⁺*, el retraso en la transición G2/M se debe a la elevada expresión de la quinasa Mik1, inhibidor de Cdc2 y cuya expresión está regulada por MBF (Caetano *et al.*, 2014). En el caso del mutante *rep2Δ* es probable que los niveles de la ciclina Cig2 sean más bajos, lo cual genera un retraso en la entrada en fase S. En este caso, el fenotipo recuerda a la inactivación de MBF en el mutante *cdc10-129* a la

temperatura restrictiva, que también presenta un fenotipo *cdc* y un retraso en la transición G1/S.

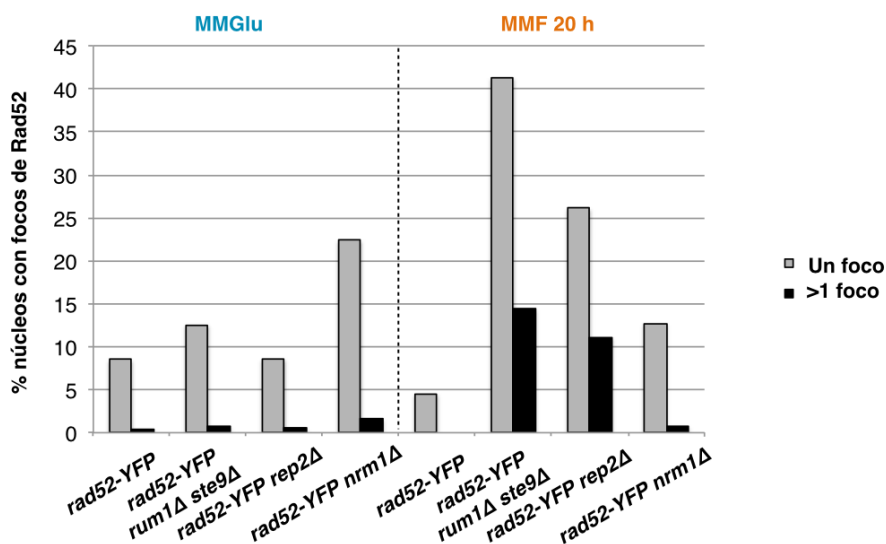


Figura 36. Menor actividad de MBF en MMF causa inestabilidad genómica. Cuantificación en 500-520 células del porcentaje de núcleos con uno o más de un foco de Rad52-YFP en MMGlu y en MMF.

En resumen, una transcripción mínima de los genes dependientes de MBF en medio pobre evita que se generen niveles altos de inestabilidad genómica. La desregulación de la actividad de MBF conlleva un cambio en la distribución de las fases del ciclo celular debido a que MBF también regula la actividad CDK, el principal regulador del orden y duración de las distintas fases del ciclo.

11. La delección de *nrm1*⁺ alivia el fenotipo del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF

Con objeto de estudiar si el incremento de la actividad de MBF podría rescatar el fenotipo del doble mutante, se construyó el triple mutante *nrm1Δ rum1Δ ste9Δ* y se analizó el fenotipo. Las células de este mutante presentaron un menor número de células alargadas que el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* tras 20 horas de cultivo en MMF (**Figura 37**).

En cuanto al contenido de DNA, el triple mutante *nrm1Δ rum1Δ ste9Δ* no mostró pico 1C en ninguna de las condiciones y el pico 2C estaba desplazado a la derecha al igual que en las células de *nrm1Δ* (**Figura 38**).

Además, se cuantificaron los porcentajes de núcleos con presencia de focos de Rad52-YFP. De forma coherente con los datos de células alargadas, el triple mutante *nrm1Δ rum1Δ ste9Δ* presentó porcentajes más bajos de daño en el DNA (**Figura 39**).

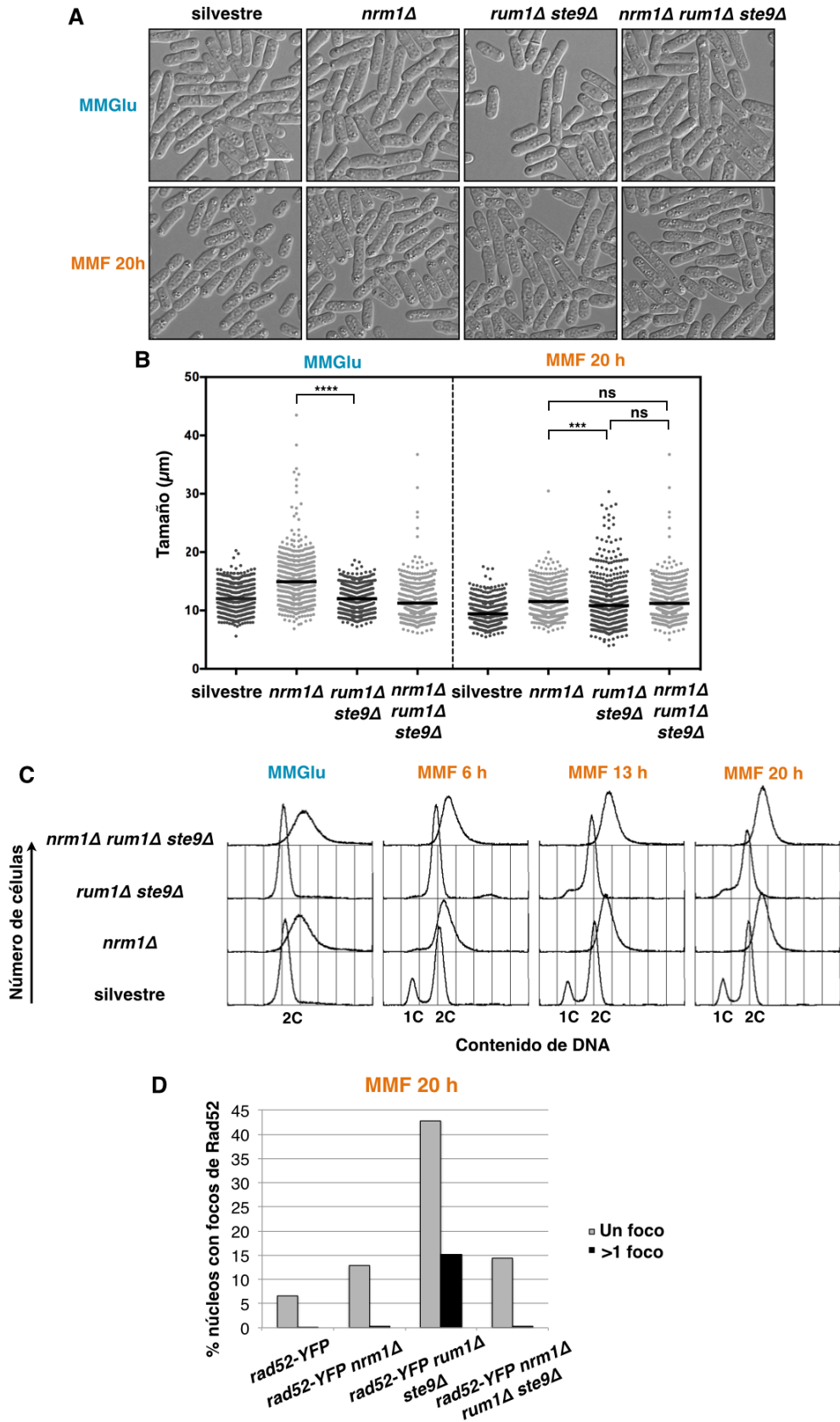


Figura 37. La delección de *nrm1*⁺ rescata el fenotipo del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF. **A.** Imágenes representativas DIC de los cultivos *in vivo*. Escala de 10 μm. **B.** Representación del tamaño de 600 células en cultivo *in vivo* medidas sobre imágenes de microscopía de una tinción con Blankophor. La delección de *nrm1*⁺ reduce el número de células largas en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF. La barra representa la media. (**p< 0,001; ****p<0,0001). **C.** Histogramas de citometría de flujo del contenido de DNA. La delección de *nrm1*⁺ reducen las células con contenido 1C en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF. **D.** Cuantificación en 500-520 células del porcentaje de núcleos con uno o más de un foco de Rad52-YFP en MMF. La delección de *nrm1*⁺ reduce los focos de daño en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF.

Estos datos indican que la delección de *nrm1*⁺ en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* extiende la fase G2 y podría incrementar la actividad de MBF, lo que mejora el fenotipo, reduce el número de células alargadas y evita que se produzca daño endógeno en el DNA.

Discusión

1. Rum1 y Ste9 son necesarios para la extensión de la fase G1 en medios pobres en nitrógeno

En la levadura de fisión *S. pombe* las condiciones de crecimiento determinan el tamaño al que las células se dividen, lo cual a su vez define la duración de las distintas fases del ciclo celular (Fantes y Nurse, 1977). Cuando los nutrientes son abundantes, la célula crece principalmente durante la fase G2 y se divide generando células hijas cuyo tamaño es superior al mínimo para iniciar la fase S. De esta forma, en medios ricos la fase G1 es muy corta. Sin embargo, en medios pobres en nutrientes, las células aceleran la entrada en mitosis y extienden la fase G1 para crecer hasta alcanzar el tamaño necesario para iniciar la fase S (Nurse, 1975; Nurse y Thuriaux, 1977; Nasmyth *et al.*, 1979; Sveiczer *et al.*, 1996).

En este trabajo, se han utilizado medios con una fuente rica de nitrógeno, como los medios YES, MM-NH₄Cl (cloruro amónico) o MMGlu (glutamato) y medio con una fuente pobre de nitrógeno MMF (fenilalanina), aunque *S. pombe* puede crecer en medios mínimos con otras fuentes pobres de nitrógeno, como la isoleucina o la prolina (Carlson *et al.*, 1999; Petersen y Nurse, 2007; Chica *et al.*, 2016). Cuanto más pobre es la fuente de nitrógeno, la actividad de TOR es menor (Álvarez y Moreno, 2006; Matsuo *et al.*, 2007; Stracka *et al.*, 2014) y el tiempo de generación de los cultivos es más largo. Concretamente en el caso del MMF a 32°C, las células tardan 6 horas en completar un ciclo celular, frente a las 2 horas o 2 horas y media en YES o MMGlu, respectivamente. Por tanto, cuando las células se crecen en un medio con una fuente pobre de nitrógeno, el cultivo crece más lento, las células reducen su tamaño celular y cambia la distribución de las fases del ciclo: la fase G2 se acorta y la fase G1 se alarga.

Cuando las células de *S. pombe* se transfieren a MM sin nitrógeno las células paran su crecimiento y se bloquean en G1 tras dos divisiones celulares. Para ello, las células activan la autofagia, lo que les permite generar suficiente nitrógeno y aminoácidos para completar la segunda división celular (Kohda *et al.*, 2007).

Rum1 y Ste9 son dos proteínas que definen la duración de la fase G1 a través de la inhibición de la actividad CDK. Previamente se había descrito que las células que carecen de *rum1⁺* o *ste9⁺* no presentan ningún fenotipo aparente en condiciones de crecimiento de laboratorio, salvo que no son capaces de bloquearse en G1 en medio sin nitrógeno y se bloquean en G2 tras dos divisiones y una fase S adicional. Los mutantes carentes de Rum1 y Ste9 tampoco conjugan y son estériles debido a que estas células no logran parar el ciclo celular en G1, un prerrequisito para activar la expresión de genes dependientes de Ste11, el factor de transcripción que activa el programa transcripcional necesario para la conjugación y la meiosis durante la fase G1 (Moreno y Nurse, 1994; Stern y Nurse, 1998; Kominami *et al.*, 1998; Mata y Bähler, 2006; Xue-Franzén *et al.*, 2006).

Además, tanto las células del mutante *rum1Δ* como las del doble mutante *rum1Δ ste9Δ* no presentan defectos mitóticos y presentan el mismo tamaño celular y tiempo de generación que la cepa silvestre. La ciclina Cdc13 en el mutante *rum1Δ ste9Δ* presenta niveles más elevados, pero se puede degradar probablemente por la acción de APC/C-Cdc20 (Moreno y Nurse, 1994; Blanco *et al.*, 2000).

En trabajos anteriores se ha observado que los niveles de la proteína Rum1 aumentan en medio sin nitrógeno (Daga *et al.*, 2003) y que en un bloqueo en G1 a la temperatura restrictiva en el mutante *cdc10-129*, la proteína Ste9 migra con un peso molecular menor en geles de poliacrilamida. Esto se relacionó con una mayor actividad de Ste9, puesto que su fosforilación por parte de la proteína Cdc2 inhibe su actividad al igual que ocurre en otros organismos (Zachariae *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 2000; Kramer *et al.*, 2000).

Nuestras observaciones sobre la acumulación de Rum1 cuando las células se transfieren a medios pobres en nitrógeno confirma los datos publicados por trabajos anteriores, así como en medio sin nitrógeno (Daga *et al.*, 2003). Por otra parte, la proteína Ste9 presentó una mayor migración en medio sin nitrógeno, lo que se corresponde con una proteína más activa (Blanco *et al.*, 2000). En este trabajo hemos demostrado que en MMF, Rum1 también se acumula progresivamente, aunque no alcanza niveles tan altos como en medio sin nitrógeno y Ste9 parece estar menos fosforilada y más activa que en medios con una fuente rica de nitrógeno, aunque no tanto como en medio sin nitrógeno (**Figura 2**).

Es posible que un aumento de la actividad de ambas proteínas esté regulado activamente en las células por mecanismos que detectan la falta o limitación de una fuente adecuada de nitrógeno para hacer frente al estrés nutricional.

En el trabajo de Daga *et al.*, 2003, proponen que la acumulación de Rum1 depende de la estabilización del mRNA, seguido de una activación transcripcional. Esta activación del transcrito 1 se ve reducida en el mutante delecionado para la MAP quinasa *sty1⁺*. Es decir, que la activación transcripcional podría estar mediada por esta quinasa. Al mismo tiempo, se ha descrito que la actividad de Sty1 aumenta rápidamente de forma transitoria tras un cambio a una fuente pobre de nitrógeno para adelantar la entrada en mitosis a través del reclutamiento de Plo1 en el SPB, donde activa a Cdc2 (Petersen y Hagan, 2005; Petersen y Nurse, 2007). También hemos

observado en nuestro laboratorio que las células del mutante *wis1DD*, que tienen a Sty1 activo de forma constitutiva, son más pequeñas, tienen una fase G1 más larga en medios ricos y niveles más altos de la proteína Rum1 (Ángela Rubio Tenor, resultados sin publicar).

Por otro lado, se sabe que mutantes del complejo TORC2, como las deleciones de *gad8⁺* o *tor1⁺*, no son capaces de bloquearse en G1 en ausencia de nitrógeno en el medio (Kawai *et al.*, 2001). Ambos mutantes, mostraron una expresión reducida de *rum1⁺*, lo que podría explicar su fenotipo. Por tanto, se sugirió que la ruta TORC2-Gad8 podría regular positivamente la expresión de *rum1⁺* (Ikeda *et al.*, 2008). Además, se ha descrito que en ausencia de nitrógeno en el medio aumenta la fosforilación y activación de Gad8, el único efector conocido de TORC2, gracias a la inhibición de la fosfatasa PP2A-Pab1, a través de la ruta de Greatwall-Endosulfina (Ppk18-Igo1). La fosfatasa PP2A-Pab1 desfosforila a Gad8 y lo inhibe. De esta forma, cuando TORC1 se inactiva, se promueve la activación de la ruta de TORC2-Gad8 a través un mecanismo que depende de la inhibición de PP2A-Pab1, lo que favorece el bloqueo en G1 y la expresión de genes necesarios para la conjugación (Martín *et al.*, 2017).

Aunque no tenemos evidencias de estas relaciones, en el futuro sería interesante estudiar en mayor profundidad si Sty1 o TORC2-Gad8 promueven la acumulación de Rum1 y la desfosforilación de Ste9 en respuesta a estrés nutricional.

En este sentido, se ha descrito en *S. cerevisiae* que TORC1 promueve la desestabilización de Sic1. Así, cuando disminuye la disponibilidad de nitrógeno y baja la actividad de TORC1, Sic1 es estabilizado gracias a la actividad de la MAP quinasa Mpk1, ortóloga de Pmk1 en *S. pombe*, y la ruta de Greatwall para coordinar el paso por *Start* (Moreno-Torres *et al.*, 2015). Aunque en *S. pombe* ambos complejos TORC1 y TORC2 activen a la MAP quinasa Pmk1 en respuesta a limitación de glucosa (Madrid *et al.*, 2016), no se conoce la posible conexión entre estos complejos y Rum1 en estrés nutricional por nitrógeno.

En cuanto a *ste9⁺*, se ha descrito que sus transcritos son inestables ya que tienen secuencias ricas en adenosina y uridina en el extremo 3' no codificante de su mRNA, implicadas en su degradación, al igual que ocurre con *rum1⁺* (Álvarez *et al.*, 2006). Los niveles de Ste9 son más altos durante la fase G1 y S, cuando está desfosforilado, y se inactiva por fosforilación al inicio de la fase S. Así, Ste9 está regulada negativamente por fosforilación mediada por Cdc2, lo que promueve su disociación de APC/C y disminuye su estabilidad (Blanco *et al.*, 2000). Sin embargo, mientras que en *S. cerevisiae* la desfosforilación y activación de Cdh1 la lleva a cabo la fosfatasa Cdc14, en *S. pombe* aún no se conoce qué fosfatasas podrían desfosforilar y activar a Ste9. Es posible que las fosfatasas que activen a Ste9 se encuentren reguladas positivamente en situaciones de estrés nutricional.

Por otra parte, en MMF la activación de la ruta de Ppk18-Igo1 inhibe a la fosfatasa PP2A para permitir la entrada en mitosis con menor actividad CDK y a un menor tamaño celular (Chica *et al.*, 2016). Esto da lugar a que se requiera menor actividad CDK para entrar en mitosis en MMF. Teniendo en cuenta que la actividad CDK inhibe

directamente a Rum1 y Ste9, es posible que Rum1 sea más estable y Ste9 esté menos fosforilada y más activa en MMF debido a una actividad CDK más baja que en medios con una fuente rica de nitrógeno.

Los resultados de los análisis por citometría de flujo realizados en los mutantes *rum1Δ*, *ste9Δ* y *rum1Δ ste9Δ* mostraron que estas células no pueden extender la fase G1 del ciclo celular y presentaron un hombro entre los picos 1C y 2C en el histograma de contenido de DNA de células probablemente en fase S (**Figura 3**). Además, las células que carecen de *rum1⁺* y *ste9⁺* entran prematuramente en fase S (**Figura 4**), lo que es coherente con la incapacidad de estas células de bloquearse en pre-Start o extender la fase G1. Estos resultados nos permiten proponer que ambas proteínas son necesarias para la extensión de la fase G1 cuando las células de *S. pombe* se crecen en MMF.

2. Rum1 y Ste9 evitan que se genere inestabilidad genómica en MMF

El hecho de que las células del mutante *rum1Δ ste9Δ* no puedan extender la fase G1 y entren prematuramente en fase S tiene consecuencias sobre el fenotipo de estas células en medios con una fuente pobre de nitrógeno.

En medios ricos en nitrógeno (MMGlu) las células del doble mutante resultan indistinguibles de la cepa silvestre y cuando se pasan a medios pobres en nitrógeno (MMF) son capaces de reducir su tamaño, es decir, aceleran la entrada en mitosis y reducen la fase G2 debido a la activación de la ruta de Ppk18-Igo1, al igual que la cepa silvestre (Chica *et al.*, 2016). Después de dos generaciones en MMF, el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* acumula células alargadas con un retraso en la fase G2 (**Figura 5**) mediado por la activación del *checkpoint* de daño en el DNA (Caspari y Carr, 1999).

Por otra parte, hemos observado en el doble mutante un mayor número de células en fase S con un tamaño pequeño en comparación con el tamaño medio de la población. El cultivo del doble mutante *rum1Δ ste9Δ* presenta además una fase S lenta, que se considera generalmente un indicio de estrés replicativo y de activación del *checkpoint* de fase S (Boddy *et al.*, 1998).

En eucariotas está bien establecido que durante la fase G1 del ciclo celular es necesario un periodo de baja actividad CDK para que ocurra la formación de los complejos pre-replicativos (pre-RC). Al final de G1 aumenta la actividad CDK, se produce el disparo de los orígenes y se inhiben los elementos necesarios para el licenciamiento. Este mecanismo evita que se produzca más de una fase S por ciclo celular (re-replicación) (revisado en Hills y Diffley, 2014). Por tanto, es coherente que en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* se produzca una entrada en fase S prematura como consecuencia de una mayor actividad CDK durante la fase G1 y que la fase S sea sensible a estrés replicativo debido a un licenciamiento insuficiente y a un disparo prematuro de orígenes.

Mediante la cuantificación de los focos de daño de Rad52-YFP, hemos visto que las células del doble mutante *rum1Δ ste9Δ* acumulan niveles muy altos de daño endógeno que son significativamente más elevados que en la cepa silvestre a tiempos cortos en MMF, donde aún no se detectaban células alargadas (**Figura 8**). Sin embargo, en MMGlu no se observaron diferencias. A tiempos más largos de 24 y 48 horas, las células del doble mutante no acumularon más focos de daño, la morfología de las células era aberrante y el cultivo dejaba de crecer (**Figura 9**). Tras 24 horas en MMF las células del doble mutante acumulan un daño endógeno que es irreversible y las células pierden viabilidad si se vuelven a crecer en medios con una fuente rica de nitrógeno.

Los resultados presentados en la memoria indican que las proteínas Rum1 y Ste9 son necesarias para extender la fase G1 en MMF y evitar una entrada prematura en fase S. La ausencia de ambas proteínas tiene graves consecuencias para las células cuando se crecen en MMF debido a que se producen niveles muy altos de daño endógeno, un enlentecimiento de la fase S, bloqueo en G2 de algunas células y finalmente, pérdida de viabilidad en este medio. De esta forma, podemos concluir que ambas proteínas son prescindibles para el crecimiento de las células de *S. pombe* en medios con una fuente rica de nitrógeno, pero son esenciales para sobrevivir en un medio con una fuente pobre de nitrógeno.

En línea con estos resultados, en *S. cerevisiae* también se ha descrito que Sic1, el ortólogo de Rum1, promueve el licenciamiento de los orígenes en la fase G1 mediante la inhibición de la actividad CDK. Las células que carecen de *sic1⁺* acumulan DSBs e inestabilidad genómica (Lengronne y Schwob, 2002). También en la levadura de gemación, se ha observado que Cdh1, ortólogo de Ste9, junto con Sic1 son necesarios para evitar inestabilidad cromosómica porque la desregulación de la actividad CDK en G1 disminuye el número de orígenes activos y durmientes (Ayuda-Durán *et al.*, 2014). De la misma forma, las células de mamíferos que tienen una actividad CDK desregulada, como en las líneas que sobreexpresan la ciclina E, la dinámica de la replicación está alterada y la fase S es más larga debido a un menor licenciamiento y mayor disparo de orígenes (Jones *et al.*, 2013). En el caso de células de mamíferos que carecen de Cdh1, una mayor actividad CDK da lugar a una entrada en fase S prematura, una mayor frecuencia de disparo de orígenes y a una velocidad reducida de las horquillas replicativas debido a la escasez de dNTPs, lo que genera inestabilidad genómica (García-Higuera *et al.*, 2008; Garzón *et al.*, en prensa).

Tanto en la levadura de gemación como en mamíferos la distribución de las fases del ciclo es diferente a la de *S. pombe*, puesto que la mayor parte del tiempo las células crecen en la fase G1. Por tanto, tiene sentido que el fenotipo de inestabilidad genómica que presentan las células de la levadura de fisión en ausencia de Rum1 y Ste9 sólo tenga lugar en MMF, donde las células aumentan el tiempo que pasan en la fase G1.

Recientemente, se ha sugerido en algunos trabajos que una baja actividad CDK confiere a las células resistencia al estrés replicativo. Por ejemplo en *S. pombe*, las células del mutante *cdc25-22* presentan una menor actividad de Cdc2 y son

resistentes a HU, al contrario que el mutante *wee1-50* a temperatura restrictiva, que presenta sensibilidad a HU (Anda *et al.*, 2016). Así, se ha descrito que el estrés replicativo de células humanas o de la levadura de fisión causado por una menor actividad de Wee1 y una mayor actividad CDK durante la fase S se debe a una desregulación del disparo de orígenes y a la depleción de los dNTPs, lo que produce bloqueo de las horquillas de replicación y daño en el DNA (Beck *et al.*, 2012; Pfister *et al.*, 2015; Anda *et al.*, 2016; Garzón *et al.*, en prensa). También se han descrito algunos sustratos de Wee1 en células de mamífero que son relevantes durante la replicación y que podrían explicar la sensibilidad del mutante *wee1-50* a HU, como la endonucleasa Mus81-Eme1 o la histona H2B (Dominguez-Kelly *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2011; Mahahan *et al.*, 2012). Debido a que en el mutante *rum1Δ ste9Δ* la actividad CDK es más alta durante la fase G1, es posible que también haya más actividad CDK en la fase S y por tanto, menor actividad de Wee1 y desregulación de sus sustratos. En *S. cerevisiae* y en células humanas, la actividad CDK activa a la endonucleasa Mus81-Eme1 al final de la fase S, cuando la mayoría del DNA está replicado, para limitar la actividad nucleolítica de la endonucleasa y evitar cortes en el DNA e inestabilidad genómica durante la replicación (Saugar *et al.*, 2013; Wyatt *et al.*, 2013). Cdc2 regula además la elección de la ruta de reparación según su actividad para promover una reparación adecuada del DNA y la supervivencia (Trovesi *et al.*, 2013). Por tanto, una alta actividad CDK en el mutante *rum1Δ ste9Δ* podría estar canalizando toda la reparación del DNA hacia la recombinación homóloga (Mahyous Saeyd *et al.*, 2014) y activando prematuramente durante la replicación del DNA a la endonucleasa Mus81-Eme1, lo que generaría DSBs e inestabilidad genómica. En este sentido, es interesante destacar que los dobles mutantes *rum1Δ wee1-50* y *ste9Δ wee1-50* son sintéticos letales, quizás por una hiperactivación de CDK durante todo el ciclo celular (Moreno y Nurse, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1997).

3. Activación de los *checkpoints* de integridad del DNA

Los *checkpoints* de integridad del DNA reconocen daño en el DNA o problemas en la replicación y una de sus funciones es retrasar la fase S o bloquear el ciclo en la fase G2 para reparar el DNA dañado antes de la mitosis (Ciccia y Elledge, 2010).

Aunque en la levadura de fisión Rad3-Rad26 fosforila muchas otras proteínas, Chk1 y Cds1 son esenciales en la activación del *checkpoint* (Rhind y Russell, 2000). Cds1 se activa durante la fase S si durante la replicación se produce un desacoplamiento entre las helicasas que desenrollan el DNA y el replisoma. Esta quinasa promueve el retraso de la fase S a través de la inhibición de Cdc2 y estabiliza las horquillas bloqueadas (Furnari *et al.*, 1999; Rhind y Russell, 2001; Boddy *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 1997). Por otro lado, Chk1 se activa ante numerosas formas de daño en el DNA tras la replicación durante la fase G2, como los DSBs. Esta quinasa también bloquea la progresión por el ciclo celular y está implicada en la regulación de la síntesis de dNTPs a través de la degradación de Spd1 (Furnari *et al.*, 1999; Rhind y Russell, 2001; Liu *et al.*, 2003).

En este trabajo hemos demostrado que la quinasa sensora Rad3 es necesaria para la viabilidad del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF. El triple mutante *rad3Δ rum1Δ ste9Δ* presentó células con fenotipo de catástrofe mitótica tras dos ciclos en MMF, así como algunas células con contenido de DNA por debajo de 1C, indicativo de la aparición de células muertas en el cultivo (**Figuras 11 y 12**). Además, el alargamiento de las células bloqueadas en G2 en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF dependía de la actividad de Rad3 y de Chk1. Sin embargo, el fenotipo de las células del mutante *rad3Δ rum1Δ ste9Δ* era más grave que las del mutante *chk1Δ rum1Δ ste9Δ*, lo que sugiere un papel de Cds1 en prevenir la entrada en mitosis en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF.

A nivel bioquímico hemos observado que Chk1 se fosforila en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* a tiempos muy cortos tras el cambio a MMF durante el primer ciclo (**Figura 14**). Por el contrario, no hemos podido detectar la fosforilación de Cds1, aunque sabemos que no se debe a problemas técnicos porque sí conseguimos detectar esta fosforilación tanto en el mutante *rum1Δ ste9Δ* como en la cepa silvestre en presencia de HU. Además, el mutante *cds1Δ rum1Δ ste9Δ* presentó un mayor número de células alargadas y de focos de daño, lo que sugiere que la actividad de Cds1 es necesaria para evitar aun más daño en el DNA (**Figura 15**). Estas observaciones son similares a las obtenidas por Sabatinos *et al.*, 2013, donde tampoco consiguieron detectar la fosforilación de Cds1 en respuesta a tratamientos con análogos de nucleósidos tóxicos (BrdU) pero se activa Chk1 y el mutante *cds1Δ* acumula más daño. El empeoramiento del fenotipo al delecionar *cds1⁺* podría deberse a una activación aberrante de la endonucleasa Mus81-Eme1, dado que en estrés replicativo Cds1 promueve la disociación de la cromatina de la endonucleasa para evitar cortes en las horquillas bloqueadas y así estabilizarlas (Boddy *et al.*, 2000; Kai *et al.*, 2005).

En este caso, proponemos que el estrés replicativo que ocurre en el mutante *rum1Δ ste9Δ* activa a Cds1 de manera transitoria, lo que promueve el bloqueo de las horquillas de replicación. Algunas horquillas bloqueadas podrían colapsar, quizás por la acción de endonucleasas, como Mus81-Eme1, lo cual provocaría la formación de DSBs y la activación de Chk1. Después de dos o tres ciclos en MMF, las células del doble mutante *rum1Δ ste9Δ* no son capaces de reparar los niveles tan altos de daño endógeno acumulado y la activación crónica de Chk1 produce una acumulación de células bloqueadas en G2, de forma similar a las células bloqueadas en G2 que se generan al sobreexpresar Chk1 (O'Connell *et al.*, 1997).

4. Un aumento de la fase G2 alivia el fenotipo de inestabilidad genómica del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF

En este trabajo también hemos analizado si al alterar la actividad CDK o las fases del ciclo celular se rescata o empeora el fenotipo del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF. La bajada de actividad CDK en el mutante hipomorfo *cdc2as-M17* rescata el fenotipo del doble mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF (**Figura 16**). Este mutante de *cdc2⁺* presentó

células de mayor tamaño y un menor número de células en G1, lo que sugiere que un retraso en la transición G2/M. De igual manera, la delección de *igo1⁺*, que genera células con una fase G2 más extensa, redujo significativamente el daño endógeno en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF (**Figura 19**). Aunque hay que reseñar que las células que carecen de Igo1 no pueden acelerar la entrada en mitosis en respuesta al cambio de medio a MMF (Chica *et al.*, 2016) y las células *cdc2as-M17* sí. De esta forma, estos resultados son consistentes con el fenotipo del propio mutante *rum1Δ ste9Δ* en medios con una fuente rica de nitrógeno, donde la fase G2 es larga y las células no presentan células alargadas ni focos de daño. Estos resultados nos permiten proponer que la extensión de la fase G2 en el doble mutante reduce el daño endógeno al extender el tiempo en el que las células pueden acabar la síntesis de DNA y reparar los daños antes de la mitosis.

Sin embargo, esto no quiere decir que la extensión de la fase G2 no tenga un coste para las células. Se ha descrito que las células que carecen de *ppk18⁺* presentan una viabilidad reducida a largo plazo en fase estacionaria o G0 (Chen *et al.*, 2013). Esta medida de envejecimiento en levaduras se conoce como CLS (del inglés *Chronological Lifespan*), que es el tiempo durante el cual se mantiene la viabilidad de la población en fase estacionaria (Fabrizio y Longo, 2003). Además, en *S. cerevisiae* también se ha descrito que la proteína Rim15, ortóloga de Ppk18, es necesaria para activar la expresión de genes necesarios para la supervivencia en G0 (Bontron *et al.*, 2013).

Por otra parte, la delección de *ppa2⁺*, una de las dos subunidades catalíticas de PP2A, en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF presentó un incremento de la población G1/S y un mayor número de células alargadas, pero que no alcanzan tamaños tan altos como las del doble mutante (**Figura 19**). Esta delección por sí sola genera células con una fase G2 corta, una aceleración de la entrada en mitosis y de menor tamaño, que de forma indirecta alargan la fase G1 (Chica *et al.*, 2016). Al contrario de lo que ocurre al deleccionar *igo1⁺*, el triple mutante *ppa2Δ rum1Δ ste9Δ* tiene mayor inestabilidad genómica en comparación con el doble mutante posiblemente debido al acortamiento de la fase G2, lo cual reduce el tiempo para acabar la síntesis del DNA y reparar el daño antes de la mitosis. En este triple mutante *ppa2Δ rum1Δ ste9Δ* hemos observado también fenotipos de catástrofe mitótica similares a los de la cepa *rad3Δ rum1Δ ste9Δ*, aunque en menor medida (**Figura 22**). Estos datos y otros publicados en *Xenopus laevis* sobre el aumento de actividad de PP2A en respuesta al daño en el DNA (Wang *et al.*, 2015) sugieren que PP2A-B55 puede jugar un papel en el checkpoint de daño en el DNA, de manera que proponemos que algunas células del triple mutante *ppa2Δ rum1Δ ste9Δ* no pueden mantener adecuadamente el bloqueo en G2 y progresan hacia la mitosis sin reparar el daño, lo que da lugar a fenotipos de catástrofe mitótica.

Además, en un ensayo de gotas en medio rico las células del doble mutante *rum1Δ ste9Δ* presentaron una ligera sensibilidad a HU (**Figura 23**). El tratamiento con HU inhibe la enzima ribonucleótido reductasa (RNR), encargada de la producción de dNTPs, y genera estrés replicativo en las células. Así, a pesar de que las células del mutante *rum1Δ ste9Δ* no muestren ningún fenotipo en medios con una fuente rica de

nitrógeno, parecen sufrir un leve estrés replicativo que no resulta en daño en el DNA. De nuevo, el retraso en la transición G2/M mediante la delección de *igo1⁺* en el doble mutante rescataba la sensibilidad a HU. Estos datos son consistentes con la idea de que la extensión de la fase G2 reduce el daño que se genera durante la fase S porque se incrementa el tiempo para acabar la replicación y reparación del DNA. Sin embargo, el acortamiento de la fase G2 con la delección de *ppa2⁺* no aumentó la sensibilidad del mutante *rum1Δ ste9Δ* a HU, del mismo modo que las células del mutante sencillo *ppa2Δ* tampoco fueron sensibles a HU. Esta diferencia con respecto a la sensibilidad descrita en las células del mutante *wee1-50* (Anda *et al.*, 2016), que también tiene una fase G2 corta, puede deberse a algún mecanismo que desconocemos donde una menor actividad de PP2A promueva la supervivencia en estrés replicativo.

Al igual que la delección de *ppa2⁺*, la eliminación de *cig2⁺* en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF presentó un mayor número de células alargadas y en fase S, lo que indica que la pérdida de la principal ciclina de G1/S en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* no mejora el fenotipo de inestabilidad genómica (**Figura 24**). La delección de *cig2⁺* da lugar a células con un ligero retraso en la transición G1/S e hiperfértiles (Obara-Ishibara y Okayama, 1994). En este caso, hemos observado que las células del triple mutante *cig2Δ rum1Δ ste9Δ* se acumulaban en la transición G1/S y eran capaces de conjugarse, aunque dando lugar a cigotos aberrantes y esporas inviables. Teniendo en cuenta que Rum1 inhibe a los complejos Cdc2-Cig2 y Cdc2-Cdc13 y que la degradación de Cig2 y Cdc13 se produce por APC/C-Ste9, podemos suponer que en ausencia de Cig2, existirán niveles más altos de Cdc13 que pueden promover una entrada prematura en fase S en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF. Estos datos también sugieren que la presencia de Cig2 en el doble mutante en MMF evita que aumenten los niveles de inestabilidad genómica.

5. La delección de *spd1⁺* reduce el daño en ausencia de Rum1 y Ste9 en MMF

Durante la fase S, la disponibilidad de dNTPs es fundamental para mantener la integridad genómica. En *S. pombe*, Spd1 es un inhibidor de la enzima ribonucleótido reductasa (RNR), encargada de la producción de dNTPs. Spd1 se degrada en el inicio de cada fase S y en situaciones de estrés replicativo (Liu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005). Los mutantes que no degradan correctamente Spd1 en la fase S presentan una replicación más lenta y son sensibles a tratamientos que generan daño en el DNA, mientras que las células que carecen de *spd1⁺* producen más dNTPs que la cepa silvestre (Holmberg, 2005).

Nuestros resultados indican que la delección de *spd1⁺* en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF alivia el fenotipo de daño de forma parcial. Las células del mutante *spd1Δ rum1Δ ste9Δ* presentaron menos células alargadas y menos focos de daño (**Figuras 27 y 28**). Además, la delección de *spd1⁺* mejoró sensiblemente el crecimiento en placas de MMF del mutante *rad3Δ rum1Δ ste9Δ*. Por tanto, el enlentecimiento de la

fase S en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* podría deberse a una reducción en los niveles de expresión de la enzima RNR, de manera que no se generen niveles suficientes de dNTPs. Cabe la posibilidad de que se produzca una reducción en la expresión de Cdc22, subunidad grande de la enzima RNR, o de Cdt2, adaptador del complejo E3 ubiquitin ligasa CRL4 (Cul4-Ddb1), implicado en la degradación de Spd1 (Ralph *et al.*, 2006; Moss *et al.*, 2010). Tanto la expresión de *cdc22⁺* como de *cdt2⁺* está regulada por el complejo MBF, lo cual genera un incremento de la actividad de RNR al inicio de la fase S (Hofmann y Beach, 1994; Maqbool *et al.*, 2003).

Sin embargo, tampoco podemos descartar que la entrada prematura en S y el disparo de orígenes temprano a causa de una mayor actividad CDK en la fase G1 en las células del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF dé lugar a la depleción de los dNTPs (Beck *et al.*, 2012; Anda *et al.*, 2016; Garzón *et al.*, en prensa).

6. La actividad de MBF está desregulada en el mutante *rum1Δ ste9Δ*

En la levadura de fisión, el paso por *Start*, al final de la fase G1, requiere un aumento de la actividad CDK y de MBF, el ortólogo funcional de E2F en mamíferos. El factor de transcripción MBF controla la expresión de genes necesarios para la replicación del DNA, la síntesis de dNTPs y la regulación de la fase S (Bahler, 2005).

El doble mutante *rum1Δ ste9Δ* en medios ricos en nitrógeno (MMGlu) tiene niveles ligeramente más bajos de Tos4-GFP y de los mRNAs de *cdc18⁺* y *cdc22⁺* (**Figura 30**). Sin embargo, en estos medios el doble mutante no presentó un fenotipo de daño endógeno, aunque sí sensibilidad a estrés replicativo inducido por HU. En el caso de que las células del doble mutante en medios ricos tuvieran problemas de estrés replicativo y activasen el *checkpoint* de fase S, Cds1 promovería la activación de MBF a través de la fosforilación e inhibición del represor Yox1 (Ivanova *et al.*, 2011). De esta forma, unos niveles más bajos de expresión de genes dependientes de MBF en medios ricos sugieren que la actividad de MBF en el doble mutante está desregulada.

En medios pobres en nitrógeno, los niveles de la proteína de fusión Tos4-GFP son también más bajos en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* que en la cepa silvestre (**Figura 31**). Se ha descrito que la activación de Chk1 en respuesta a daño en el DNA promueve la represión de la actividad de MBF en algunos promotores de genes de fase S a través de la fosforilación de Cdc10 en las serinas 720 y 732 (Ivanova *et al.*, 2013). El hecho de que en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* la quinasa Chk1 se active a las 5 horas tras el cambio de medio a MMF podría explicar una bajada de la actividad de MBF por la activación del *checkpoint* de daño. Sin embargo, sería interesante probar si este efecto revierte en el triple mutante deficiente en la activación de este *checkpoint*, *chk1Δ rum1Δ ste9Δ*.

Mediante microscopía hemos observado que en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* además de haber menos células que tengan señal nuclear de Tos4-GFP, esta señal es menos intensa que en la cepa silvestre (**Figura 32**). La expresión de Tos4-GFP

ocurre antes, al igual que la entrada en fase S en las células *rum1Δ ste9Δ*. Todo ello en MMGlu y a tiempos muy cortos tras el cambio de medio a MMF. Estos resultados sugieren que la actividad de MBF se encuentra desregulada en el doble mutante tanto en medios ricos como en MMF, antes de que se active Chk1. Como se ha mencionado en el apartado de introducción, la actividad CDK es la encargada de la activación de MBF (Reymond *et al.*, 1993; Banyai *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta que APC/C-Ste9 promueve la degradación del activador transcripcional Rep2 (Chu *et al.*, 2009), la ausencia de Ste9 también podría dar lugar a niveles más altos de Rep2 durante G1. Por tanto, cabría esperar que en el mutante *rum1Δ ste9Δ* se produjera no sólo un adelanto de la expresión de Tos4-GFP en el ciclo celular sino a niveles más altos. Sin embargo, si en doble mutante al mismo tiempo hay una mayor actividad de Cig2 o una menor degradación del represor de MBF Nrm1 por la ausencia de Ste9, podría haber una inhibición de MBF. Esto podría explicar por qué se produce una activación temprana de MBF y una menor oleada de expresión génica.

Por otro lado, el rescate parcial al delecionar *spd1⁺* en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* podría deberse a una menor expresión de *cdc22⁺* y de *cdt2⁺*, debido a que ambos genes se encuentran regulados transcripcionalmente por el complejo MBF, cuya actividad es menor (Hofmann y Beach, 1994; Maqbool *et al.*, 2003). Por tanto, se podría analizar si la sobreexpresión de Cdc22 o Cdt2 también rescata el fenotipo del doble mutante *rum1Δ ste9Δ*.

7. Una baja actividad de MBF causa inestabilidad genómica en medios pobres en nitrógeno

Rep2 es un activador transcripcional de MBF que se une al complejo a través de Res2. Se ha descrito que las células de *S. pombe* que carecen de Rep2 presentan una transcripción dependiente de MBF mucho más reducida (Nakashima *et al.*, 1995; Baum *et al.*, 1997; Tahara *et al.*, 1998). Esto es coherente con los niveles de mRNAs de *cdc18⁺* y *cdc22⁺* que hemos obtenido en el mutante *rep2Δ* utilizado como control, que son incluso más bajos que en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMGlu.

Por otra parte, Nrm1 y Yox1 son dos represores de la actividad de MBF. Tanto la delección de *yox1⁺* como la de *nrm1⁺* generan células con una activación constitutiva de la transcripción dependiente de MBF. Estas células presentan fenotipos de inestabilidad genómica y células más largas (Gómez-Escoda *et al.*, 2011; Caetano *et al.*, 2014). Nuestras observaciones al comparar los fenotipos que presentan las células carentes de Rep2 o de Nrm1 indican que en MMF una baja actividad de MBF genera mayor daño en el DNA que una elevada actividad de MBF (**Figura 36**). Por tanto, es necesaria una expresión mínima de los genes dependientes de MBF para proteger a las células del estrés replicativo generado en fase S en medios pobres en nitrógeno.

Probablemente y aunque nuestros datos son preliminares, se requiera una mayor actividad de MBF al final de la fase G1 para completar con éxito la replicación de DNA en medios pobres en nitrógeno. De hecho, se ha descrito que mientras que las células

del mutante *nrm1Δ* son resistentes a HU, las de *rep2Δ* son sensibles a HU y a MMS, agentes que inducen estrés replicativo y daño (de Bruin *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2012). Además, aunque no hemos detectado diferencias en los niveles de Tos4-GFP a tiempos largos tras el cambio de medio en MMF, sí se aprecia un leve incremento de los niveles de Ste9, cuya expresión también está regulada por MBF.

En este sentido, se ha descrito que el complejo TORC2 está implicado en la supervivencia celular en diferentes situaciones de estrés y que MBF se activa a través de Gad8 para hacer frente al estrés replicativo inducido por HU (Cohen *et al.*, 2016). Por tanto, sería razonable pensar que el complejo TORC2 o la bajada de la actividad del complejo TORC1 en MMF pudiera favorecer un aumento de la actividad de MBF para evitar la inestabilidad genómica durante el estrés nutricional.

Por otra parte, en mamíferos se ha observado que la actividad de E2F, ortólogo de MBF, está desregulada en diferentes tipos de tumores y que unos niveles altos de la transcripción dependiente de E2F promueven tanto la proliferación de células cancerosas como la protección frente al estrés replicativo que se genera (Chen *et al.*, 2009; Bertoli *et al.*, 2016).

También hemos observado que el tamaño general de las células del mutante *nrm1Δ* es ligeramente mayor tanto en MMGlu como en MMF, mientras que el tamaño de las células del mutante *rep2Δ* es ligeramente mayor en MMGlu y son muy largas en MMF (**Figura 34**). Se ha descrito que el retraso en la transición G2/M en las células que carecen de *nrm1⁺* se debe a un aumento de la quinasa Mik1, que inhibe a Cdc2 por fosforilación en la Y15 y cuya expresión está regulada por MBF (Caetano *et al.*, 2014). Según nuestros resultados, las células carentes de Rep2 presentan una mayor población de células en G1, probablemente debido a un retraso en la activación de MBF. Sería interesante comprobar si este retraso en G1 se debe a unos niveles más bajos de Cig2, puesto que la expresión de esta ciclina también está controlada por el complejo MBF (Ayté J. *et al.*, 2001). El mutante *mik1Δ* presenta células con un fenotipo similar a la cepa silvestre, pero la delección de Mik1 en el mutante *nrm1Δ* rescata el fenotipo de retraso de G2/M (Caetano *et al.*, 2014). De la misma manera, la sobreexpresión de Cig2 podría corregir el retraso en G1/S en el mutante *rep2Δ*. Por tanto, es posible que al mismo tiempo que la actividad CDK controla la actividad de MBF, el complejo MBF también regule la actividad CDK y la distribución de las fases del ciclo, asegurando así que el sistema sea robusto.

Sin embargo, el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF presenta un fenotipo de daño mayor (mayor porcentaje de focos de Rad52-YFP) que en el caso de las células del mutante *rep2Δ*, posiblemente debido a una combinación de una oleada menor de expresión de genes dependientes de MBF y a una mayor actividad CDK que impide la extensión de la fase G1 en un medio donde la fase G2 es corta y las células tienen menos tiempo para acabar la replicación y reparar el DNA (**Figura 38**). El fenotipo de las células *rep2Δ* recuerda al del mutante *cdc10-129* a la temperatura semi-restrictiva (32°C), con células alargadas y un retraso en G1/S (Nurse *et al.*, 1976). Teniendo en cuenta que los mutantes *rum1Δ* y *cdc10-129* a la temperatura semi-restrictiva son sintéticos letales (Moreno y Nurse, 1994), y según datos preliminares de nuestro

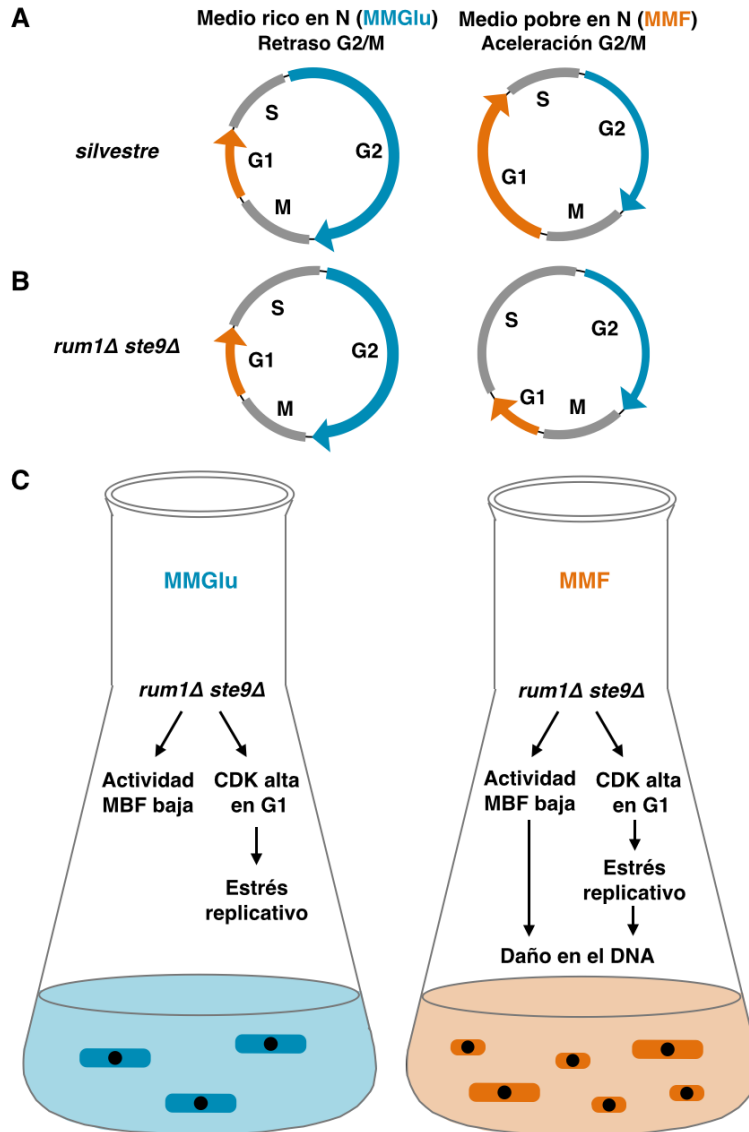


Figura 38. Modelo de los defectos descritos en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMGlu y MMF. **A.** En medio pobre en nitrógeno (MMF), se acelera la entrada en mitosis, la fase G2 se acorta, las células se dividen a un menor tamaño celular y se produce una extensión de la fase G1 en comparación con la distribución de las fases del ciclo celular en medios ricos en nitrógeno, como MMGlu. **B.** Las células del doble mutante *rum1Δ ste9Δ* presentan probablemente una fase S más larga incluso en medios ricos, donde son sensibles a HU. En medio pobre MMF, la fase G2 se acorta tanto en el mutante *rum1Δ ste9Δ* como en la cepa silvestre, pero en el mutante la fase G1 no se extiende, entran prematuramente en fase S y debido al estrés replicativo, la fase S es más larga. **C.** En medio rico MMGlu, las células del doble mutante *rum1Δ ste9Δ* presentan una actividad de MBF más baja y una actividad CDK más alta en la fase G1, lo que podría ser la causa del estrés replicativo, pero no del daño en el DNA posiblemente porque durante la fase G2, que es larga en medios ricos, tienen suficiente tiempo para reparar el DNA. Por el contrario, en medio con una fuente pobre de nitrógeno (MMF), la desregulación de la actividad CDK y de MBF genera en estas células un fenotipo de inestabilidad genómica y baja viabilidad que no puede ser corregido al ser la fase G2 del ciclo celular muy corta.

laboratorio, es probable que *rep2Δ* también sea sintético letal en combinación con *rum1Δ* (Natalia García Blanco, resultados sin publicar).

Por otra parte, se ha descrito que el mutante Yox1.SATA, donde Yox1 no se puede fosforilar por Cds1 para promover la transcripción de genes dependientes de MBF en respuesta a estrés replicativo, muestra sensibilidad a HU sólo cuando se combina con la mutación *wee1-50*. En este mutante la fase G2 es corta y las células tienen menos tiempo para recuperarse del estrés inducido por HU (Gómez-Escoda *et al.*, 2011). Este resultado es coherente con que una menor actividad de MBF en el mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF, donde la fase G2 es corta, sea perjudicial para las células.

Por el contrario, hemos observado que la delección de *nrm1⁺* rescataba el fenotipo de daño del doble mutante *rum1Δ ste9Δ* (**Figura 37**). En este caso, no ha sido posible diferenciar si el rescate producido por la pérdida de *nrm1⁺* se debe a un aumento de la actividad de MBF o a la extensión de la fase G2 del ciclo celular. Por tanto, sería interesante probar cuáles son las dianas de MBF más relevantes cuya expresión disminuye en el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* para evitar o reducir el daño en el DNA sin afectar a la duración de la fase G2, que es corta en MMF, así como analizar el fenotipo de la delección de *nrm1⁺* y *mik1⁺* en el doble mutante.

Conclusions

1. Fission yeast cells growing in nitrogen-poor medium (MMPhe), extend the G1-phase, accumulate the CDK inhibitor Rum1 and show decreased inhibitory phosphorylation in the APC activator Ste9.
2. Rum1 and Ste9 proteins are required for the G1-phase extension when cells grow in a nitrogen-poor medium, such as MMPhe.
3. Fission yeast cells lacking Rum1 and Ste9 proteins undergo replicative stress in nitrogen-rich media, MMGlu. In nitrogen-poor media, MMPhe, *rum1* Δ *ste9* Δ mutant cells initiate S-phase prematurely, show a slow S-phase, and accumulate high levels of DNA damage, which results in increasing numbers of G2-arrested cells with elongated phenotype over time.
4. Cell cycle arrest of the *rum1* Δ *ste9* Δ mutant cells in MMPhe depends on the activation of the DNA damage checkpoint. The increased DNA damage in the *rum1* Δ *ste9* Δ *cds1* Δ triple mutant cells suggests that in MMPhe the S-phase checkpoint is activated transiently.
5. Lengthening of the G2 phase or decreasing the CDK activity in *rum1* Δ *ste9* Δ cells growing in MMPhe rescues the DNA damage phenotype, probably due to an increase in the time to complete the S-phase or DNA repair.
6. *rum1* Δ *ste9* Δ mutant cells in MMPhe undergo DNA damage partially due to a decrease in the dNTPs pools resulting from reduced levels of ribonucleotide reductase or improper Spd1 degradation.
7. In *rum1* Δ *ste9* Δ mutant cells MBF-dependent transcription is reduced, and it is activated prematurely, as the onset of S-phase.
8. Cells deleted for *rep2*⁺, with lower MBF activity, show a delay at the G1/S transition and genomic instability in MMPhe, but not in nitrogen-rich media.
9. In the *rum1* Δ *ste9* Δ double mutant growing in MMPhe, higher CDK activity during G1 and lower MBF activity leads to high DNA damage levels and low viability.

Conclusiones

1. Las células de la levadura de fisión cuando crecen en medio con una fuente pobre de nitrógeno (MMF) extienden la fase G1, acumulan el inhibidor de CDK Rum1, y muestran menor fosforilación inhibidora en el activador de APC, Ste9.
2. Las proteínas Rum1 y Ste9 son necesarias para la extensión de la fase G1 del ciclo celular cuando las células crecen en medios con una fuente pobre de nitrógeno, como MMF.
3. Las células de la levadura de fisión que carecen de las proteínas Rum1 y Ste9 sufren estrés replicativo en medio con una fuente rica de nitrógeno, MMGlu. En medios pobres en nitrógeno, como MMF, las células del mutante *rum1Δ ste9Δ* entran en fase S de forma prematura, la fase S es más lenta, acumulan daño endógeno en el DNA, lo que da lugar a un número creciente de células bloqueadas en G2 que se alargan.
4. El bloqueo de las células del mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF depende de la activación del *checkpoint* de daño en el DNA. El aumento del daño en el DNA del mutante *rum1Δ ste9Δ cds1Δ* sugiere que en MMF el *checkpoint* de replicación durante la fase S se activa de forma transitoria.
5. La extensión de la fase G2 y la disminución de la actividad CDK en las células *rum1Δ ste9Δ* en MMF rescata el fenotipo de daño en el DNA, probablemente debido al aumento del tiempo para completar la fase S y reparar el DNA.
6. El daño en el DNA en las células del doble mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF se debe parcialmente a la escasez de dNTPs, bien por una reducción de los niveles de la enzima ribonucleótido reductasa o a una degradación inadecuada de Spd1.
7. En las células del mutante *rum1Δ ste9Δ*, la transcripción dependiente de MBF es menor y se activa prematuramente, al igual que la fase S.
8. Las células que carecen de *rep2⁺*, con menor actividad del complejo MBF, presentan un retraso en la transición G1/S e inestabilidad genómica en MMF, pero no en medios ricos.
9. En el doble mutante *rum1Δ ste9Δ* en MMF, una mayor actividad CDK durante la fase G1 y una menor actividad de MBF da lugar a células con niveles muy altos de daño en el DNA y una baja viabilidad.

Materiales y métodos

1. Microorganismos y medios de cultivo

1.1 Microorganismos

Las cepas de *Schizosaccharomyces pombe* que se utilizaron en este trabajo están descritas en la **Tabla 1**. Para la amplificación de plásmidos, se utilizaron células competentes preparadas en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG) de la cepa DH5a de *Escherichia coli* de la **Tabla 2**.

Tabla 1. Cepas de *Schizosaccharomyces pombe*.

Cepa	Genotipo	Procedencia
S2666	<i>h⁻ 972</i>	S. Moreno
S2433	<i>h⁺ 975</i>	S. Moreno
S177	<i>h⁺ cdc10-129</i>	S. Moreno
S377	<i>h⁻ HA:rum1</i>	S. Moreno
S1475	<i>h⁻ rum1::ura4⁺ ura4-D18</i>	S. Moreno
S2031	<i>h⁻ ste9::ura4⁺ ura4-D18</i>	S. Moreno
S2800	<i>h⁻ rum1::kanMX6 ste9::ura4⁺ ura4-D18</i>	Este trabajo
S2801	<i>h⁺ ura4-D18::P3nmt1-Tk-ura4⁺</i>	Este trabajo
S2802	<i>h⁺ ura4-D18::P3nmt1-Tk-ura4⁺ rum1::kanMX6 ste9::natMX6</i>	Este trabajo
S2508	<i>h⁻ rad52:YFP:kanMX6</i>	S. Moreno
S2803	<i>h⁻ rad52:YFP:kanMX6 ste9::natMX6 rum1::hphMX6</i>	Este trabajo

S2366	<i>h⁻ rad3::kanMX4</i>	S. Moreno
S2804	<i>h⁻ rad3::kanMX4 rum1::ura4⁺ ste9::natMX6</i>	Este trabajo
S1013	<i>h⁻ chk1::ura4⁺ ura4-D18</i>	S. Moreno
S2805	<i>h⁻ chk1::ura4⁺ ura4-D18 rum1::hphMX6 ste9::natMX6</i>	Este trabajo
S1363	<i>h⁻ cds1::ura4⁺ ura4-D18</i>	S. Moreno
S2806	<i>h⁻ cds1::ura4⁺ ura4-D18 rum1::hphMX6 ste9::natMX6</i>	Este trabajo
S2807	<i>h⁺ cds1:HA:ura4⁺ ura4-D18</i>	S. Moreno
S2808	<i>h⁺ cds1:HA:ura4⁺ ura4-D18 ste9::natMX6 rum1::kanMX6</i>	Este trabajo
S2809	<i>h⁺ cds1:HA:ura4⁺ ura4-D18 rad3::hphMX6</i>	Este trabajo
S2810	<i>h⁺ cds1:HA:ura4⁺ ura4-D18 rum1::kanMX6 ste9::natMX6 rad3::hphMX6</i>	Este trabajo
S2811	<i>h⁻ chk1:HA</i>	Este trabajo
S2812	<i>h⁻ chk1:HA ste9::natMX6 rum1::kanMX6 clon 1</i>	Este trabajo
S2813	<i>h⁻ chk1:HA ste9::natMX6 rum1::kanMX6 clon 2</i>	Este trabajo
S2814	<i>h⁻ rad52:YFP:kanMX6 cds1::ura4⁺ ura4-D18</i>	Este trabajo
S2815	<i>h⁻ rad52:YFP:kanMX6 cds1::ura4⁺ ura4-D18 ste9::natMX6 rum1::hphMX6</i>	Este trabajo
S2816	<i>h⁻ rad52:YFP:kanMX6 cdc2-asM17</i>	Este trabajo
S2817	<i>h⁻ rad52:YFP:kanMX6 cdc2-asM17 rum1::hphMX6 ste9::natMX6</i>	Este trabajo
S2339	<i>h⁻ igo1:: ura4⁺ ura4-D18</i>	S. Moreno
S2818	<i>h⁻ igo1:: ura4⁺ ura4-D18 rum1::kanMX6 ste9::natMX6</i>	Este trabajo
S2819	<i>h⁻ ppa2:: ura4⁺ ura4-D18</i>	S. Moreno
S2820	<i>h⁻ ppa2:: ura4⁺ ura4-D18 rum1::kanMX6 ste9::natMX6</i>	Este trabajo
S2821	<i>h⁻ igo1:: ura4⁺ ura4-D18 rum1::kanMX6 ste9::natMX6 spd1::hphMX6</i>	Este trabajo
S2822	<i>h⁻ ppa2:: ura4⁺ ura4-D18 rum1::kanMX6 ste9::natMX6 spd1::hphMX6</i>	Este trabajo
S2823	<i>h⁻ igo1:: ura4⁺ ura4-D18 rad52:YFP:kanMX6</i>	Este trabajo
S2824	<i>h⁻ igo1:: ura4⁺ ura4-D18 rad52:YFP:kanMX6 rum1::hphMX6 ste9::natMX6</i>	Este trabajo
S2825	<i>h⁻ ppa2:: ura4⁺ ura4-D18 rad52:YFP:kanMX6</i>	Este trabajo
S2826	<i>h⁻ ppa2:: ura4⁺ ura4-D18 rad52:YFP:kanMX6 rum1::hphMX6 ste9::natMX6</i>	Este trabajo
S349	<i>h⁻ cig2:: ura4⁺ ura4-D18</i>	S. Moreno
S2827	<i>h⁻ cig2::ura4⁺ rum1:: ura4⁺ ura4-D18 ste9::natMX6</i>	Este trabajo

S2828	<i>h⁻ rad52::YFP:kanMX6 cig2:: ura4⁺ ura4-D18</i>	Este trabajo
S2829	<i>h⁻ rad52::YFP:kanMX6 cig2:: ura4⁺ ura4-D18 ste9::natMX6 rum1::hphMX6</i>	Este trabajo
S2834	<i>h⁻ spd1::hphMX6</i>	Este trabajo
S2835	<i>h⁻ rum1::kanMX6 ste9:: ura4⁺ ura4-D18 spd1::hphMX6</i>	Este trabajo
S2836	<i>h⁻ rum1::ura4⁺ ste9::natMX6 rad3::kanMX6 spd1::hphMX6</i>	Este trabajo
S2837	<i>h⁻ rad52::Tdt:hphMX6</i>	Este trabajo
S2838	<i>h⁻ rad52::YFP:kanMX6 spd1::hphMX6</i>	Este trabajo
S2839	<i>h⁻ rad52::Tdt:hphMX6 spd1::hphMX6 rum1::kanMX6 ste9::natMX6</i>	Este trabajo
S2840	<i>h⁻ tos4::GFP:kanMX6</i>	Este trabajo
S2841	<i>h⁻ tos4::GFP:kanMX6 rum1::hphMX6 ste9::natMX6</i>	Este trabajo
S2842	<i>h⁺ rep2::ura4⁺ ura4-D18</i>	Este trabajo
S2663	<i>h⁻ nrm1::kanMX6</i>	J. Ayté
S2843	<i>h⁻ nrm1::kanMX6 rum1::hphMX6 ste9::natMX6</i>	Este trabajo
S2844	<i>h⁻ rad52::YFP:kanMX6 rep2:: ura4⁺ ura4-D18</i>	Este trabajo
S2845	<i>h⁺ rad52::YFP:kanMX6 nrm1::kanMX6</i>	Este trabajo
S2846	<i>h⁺ rad52::YFP:kanMX6 nrm1::kanMX6 ste9::natMX6 rum1::hphMX6</i>	Este trabajo

Tabla 2. Cepas de *Escherichia coli*.

Cepa	Genotipo	Procedencia
DH5 α	<i>F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	IBFG

1.2 Cultivos de *S. pombe*

Las células de *S. pombe* se crecieron en los medios previamente descritos en Moreno *et al.* 1991. Los medios ricos utilizados fueron YES, compuesto por extracto de levadura 0,5% y glucosa 3%, suplementado con 250 mg/l de histidina, leucina, uracilo, adenina y lisina; medio mínimo compuesto por ftalato ácido de potasio 14,7 mM, bifosfato de sodio 15,5 mM, glucosa 2%, sales, vitaminas y minerales (Moreno *et al.* 1991), con cloruro amónico 93,5 mM (MMNH₄Cl) o con glutamato 20 mM (MMGlu) como fuente de nitrógeno. El medio con una fuente de nitrógeno pobre utilizado fue medio mínimo con fenilalanina 20 mM (MMF). En algunos casos, se utilizó medio mínimo sin nitrógeno (MM-N). Cuando fue necesario durante la construcción de cepas

el medio mínimo se suplementó con 225 µg/ml de adenina, uracilo o leucina dependiendo de las auxotrofías de las cepas, aunque para todos los experimentos realizados empleamos cepas protótrofas. Como medio de esporulación se empleó MEA (extracto de malta agar). Así, los mismos medios fueron utilizados para el crecimiento en placa añadiéndoles agar al 2%. Todos los datos presentados de células crecidas en MMF fueron realizados tras el crecimiento de las células durante al menos 24 horas en YES y otras 24 horas en MMGlu. Para cambiar las células de un medio a otro se realizó un lavado con el siguiente medio a utilizar centrifugando las células para eliminar el medio del cultivo anterior.

Para seleccionar cepas resistentes a antibióticos se empleó medio YES-agar suplementado con geneticina (G-418, Duchefa Biochemie) a una concentración final de 100 µg/ml, nourseotricina (ClonNat, Werner BioAgents) a una concentración final de 75 µg/ml o higromicina B (Roche) a una concentración final de 50 µg/ml. Para la preparación de placas de YES suplementadas con Hidroxiurea (HU, Sigma), se preparó una solución concentrada en agua a 1M y se añadió la cantidad necesaria para que la concentración final fuera de 5 mM pocas horas antes del experimento.

Las cepas utilizadas para cada ensayo proceden de una estría en placa de YES agar desde una solución de YES con glicerol al 20% guardadas a -80°C. Las células se crecieron en baños con una agitación constante de 110 rpm, exceptuando los preinóculos en YES y cuando se requerían volúmenes grandes de cultivo, donde se utilizó un incubador de aire a 200 rpm. La temperatura de crecimiento utilizada habitualmente fue de 32°C.

1.3 Cultivos de *E. coli*

Los cultivos de *E. coli* se crecieron según los protocolos descritos por Sambrook *et al.*, 1989. Se utilizó medio LB (Luria-Bertani) con 100 µg/ml de ampicilina (Roche) para la selección de clones a una temperatura de 37 °C.

2. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos

2.1 Extracción de plásmidos de DNA en *E. coli*

Para amplificar plásmidos se transformaron células competentes de *E. coli* y se aislaron los plásmidos de varios cultivos a pequeña escala en "Minipreparaciones". Para ello se utilizaron columnas del QIAprep Spin Miniprep *kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2 Digestión de DNA con enzimas de restricción

Se realizaron digestiones de DNA utilizando enzimas de restricción de Thermo Scientifics y New England Biolabs utilizando las soluciones, la temperatura y el tiempo recomendados en cada caso por los fabricantes.

2.3 Electroforesis de DNA/RNA

La separación por tamaños de fragmentos de DNA se realizó por electroforesis en geles de agarosa (Seakem LE) de entre el 0,8% y el 2% de concentración. Para la visualización de las moléculas de DNA bajo luz UV, se le añadió al gel de agarosa Midori Green (Nippon Genetics) al 0,005 % antes de polimerizar. Se utilizó como tampón de electroforesis y para preparar el gel TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM). Para comparar los tamaños se utilizó el marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) y se emplearon cubetas de Apelex y fuentes para electroforesis de BioRad. Las separaciones electroforéticas se realizaron a un voltaje constante de 90 V.

Para visualizar el RNA ribosomal la electroforesis se realizó de forma similar, pero en una cubeta debidamente limpia sólo para RNA y utilizando agua DEPC para preparar el tampón TAE.

2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de fragmentos de DNA mediante la técnica de PCR se utilizó un termociclador T3000 de Biometra. Las condiciones de la reacción se modificaron según el tamaño del fragmento a amplificar y los oligonucleótidos utilizados en cada caso. En cada reacción se añadió plásmido o biomasa de *S. pombe* previamente calentada en el microondas durante 1,5 minutos a máxima potencia, 250 μ M de cada dNTP, 1 μ M de cada oligonucleótido, $MgCl_2$ a 1,5 mM, 0,25 U de polimerasa y el tampón de reacción suministrado, en un volumen final de 50 μ l o de 100 μ l. Como polimerasa se utilizó la DNA polimerasa Biotaq (Bioline).

2.5 Extracción de RNA

Se recogieron 1×10^8 células de cultivos en fase exponencial (DO_{595nm} entre 0,3 y 0,8), se lavaron en agua estéril fría y tras centrifugar y eliminar el sobrenadante, se congelaron los pellets a $-80^\circ C$. Para la extracción de RNA se utilizaron columnas del RNeasy Mini Kit (Qiagen) y se siguieron las instrucciones del fabricante. La concentración del RNA se midió en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo) y se comprobó la calidad mediante las lecturas 260/280 (ácidos nucleicos/ proteínas, óptimo >2) y 260/230 (ácidos nucleicos/ componentes orgánicos, óptimo $>1,8$). Además, se comprobó la integridad del RNA mediante una electroforesis en gel de agarosa para visualizar el RNA ribosomal 18S y 28S.

2.6 PCR cuantitativa

Los experimentos de PCR cuantitativa se realizaron en el termociclador BioRad CFX utilizando el fluorocromo SYBR-Green del *kit* One-Step Real Time RT-PCR (Thermo). Cada PCR se realizó en un volumen final de 20 μ l con 0,2 μ M de cada oligonucleótido (**Tabla 3**) y 300 ng de RNA, mas la mezcla de tampón y enzimas en las cantidades especificadas por el fabricante. Cada reacción se realizó por triplicado en cada experimento y las condiciones de las PCR fueron las siguientes: 30 minutos a $48^\circ C$,

10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 58°C y 1 minuto a 60°C, y finalmente, una curva de separación de las hebras desde 58°C hasta 95°C tomando medidas cada medio grado para determinar el número de amplicones.

Para calcular el enriquecimiento de los mRNAs de *cdc22⁺* y *cdc18⁺*, se utilizó la fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{E_{f_{gen}} (-Ct_{gen})}{E_{f_{actina}} (-Ct_{actina})}$$

donde Ef es la eficiencia de la pareja de oligonucleótidos y debe ser un valor cercano a 2 y Ct el número de ciclos en el que la curva de la PCR se cruza con la línea umbral, ambos obtenidos con el programa BioRad CFX manager.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en las PCRs cuantitativas.

Nombre	Secuencia
Cdc22-Fw	ACACACTCAAGATGTGTGCTATGAT
Cdc22-Rv	CATTAGTTCCAGCAATATACGAACC
Cdc18-Fw	TAAATTACCCACAACACCTCAAAC
Cdc18-Rv	ATGGAACAGGATTACATGTACGATT
Act-Fw	CCTTGCTTGTTGACTGAGGCTC
Act-Rv	GCAACATAAAAGGCAGGTGCAT

3. Técnicas de transformación

3.1 Transformación de *S. pombe*

La transformación de células de *S. pombe* se realizó siguiendo una modificación del método del acetato de litio (LiAc) descrito por Bähler *et al.*, 1998. Esta técnica se empleó tanto para realizar delecciones sencillas como para generar dobles o triples mutantes con las cepas *rum1Δ* o *ste9Δ* que no conjugan. Para cada transformación se utilizaron 2×10^8 células de un cultivo en fase exponencial y lo mismo para el control negativo sin DNA por cada fondo genético. La cantidad de DNA empleada para cada transformación fue de entre 10 y 20 µg procedente de tres PCRs de 100 µl.

En primer lugar, las células se centrifugaron 5 minutos a 3000 rpm y se lavaron con agua estéril. Las células se resuspendieron en una solución de LiAc 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM y sorbitol 1 M y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 rpm y se dejaron en 100 µl de la misma solución, donde se les añadió 5 µl de DNA de esperma de salmón previamente desnaturalizado y el DNA transformante en un volumen máximo de 10 µl. Esta mezcla se dejó incubar durante 10 minutos. Luego, se le añadió 260 µl de una solución PEG 3350 40%, LiAc 100 mM Tris-HCl 10 mM pH

7,5 y EDTA 1 mM que se incubó durante 1 hora. Posteriormente, se añadió 43 µl de DMSO y se les aplicó un choque térmico a 42°C durante 5 minutos. Finalmente, las células se lavaron y resuspendieron en 500 µl de agua estéril y se sembraron en dos placas de YES agar. Tras aproximadamente 20 horas de incubación de las placas a 32°C en estufa, se replicaron al medio selectivo correspondiente.

3.2. Transformación de *E. coli*

Se siguió una adaptación más breve del método descrito por Kushner, 1978 para plásmidos concentrados. Se descongelaron células competentes en hielo, se les añadió el DNA y se incubaron en hielo durante un minuto. A continuación, se les dio un choque térmico a 42°C durante 90 segundos y, rápidamente, se transfirieron a hielo durante 2 minutos. Luego, se les añadió 300 µl de medio LB y se sembraron 10 y 50 µl en placas de LB con ampicilina para seleccionar las colonias resistentes con el plásmido que crecen tras una noche en estufa a 37°C.

4. Deleción de genes en *S. pombe*

Se realizaron al menos tres PCRs de 100 µl para amplificar el *cassette* de resistencia al antibiótico, utilizando como DNA molde los plásmidos *pFA6a-KanMX6* para kanamicina, *natMX6* para nourseotricina o *hphMX6* para higromicina (Bähler *et al.*, 1998; Hentges *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005). Los oligonucleótidos utilizados (genX-D1 es el *forward* y genX-D2 es el *reverse*, **Tabla 4**) fueron de 100 pares de bases. Los 80 nucleótidos en el extremo 5' anillan por fuera de los extremos del gen a delecionar y los 20 nucleótidos en el extremo 3' (en color azul) anillan con los extremos del gen de resistencia y permiten amplificar el *cassette*. El producto de PCR obtenido se precipitó con acetato sódico 3 M y etanol 100% a -20°C y se concentró en un volumen de 10 µl de TE. Este DNA se utilizó directamente para transformar células de *S. pombe* del fondo genético deseado. Los extremos del DNA transformante permiten que se produzcan eventos de recombinación homóloga y la integración del *cassette* de resistencia al antibiótico en el lugar del gen a delecionar. Para comprobar las deleciones, se realizaron PCRs de los flancos del gen delecionado donde se utilizaron oligonucleótidos externos al gen (genX-C1 y genX-C2, **Tabla 4**) y oligonucleótidos que anillan dentro de todos los *cassettes* de resistencia hacia los extremos (Kan-C1 y Kan-C2) (**Tabla 4**). Los oligonucleótidos utilizados para las PCRs fueron sintetizados por Thermo Scientific, Biomers o Sigma.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en la construcción de cepas.

Nombre	Secuencia	Utilidad
rum1-D1	TACAGCTCTTCTGATAATCCGCTCGATACATAAAG GATTTCTTCTTGCATTTACCTGGTTTTTGGATTGTCA GTCGCTCGTACGCTGCAGGTGCAG	Deleción de <i>rum1</i> ⁺
rum1-D2	ATGAATAAGGCAGAAGAGTATTTTCGTGATTGGGCAT	Deleción de <i>rum1</i> ⁺

	TTATATAAACGGTATCAAACACAATTACAAAATGCG AAAAAAGATCGATGAATTCGAGCTCG	
rum1-C1	TATCAAAGCGCAGTCGCTAG	Comprobación de delección de <i>rum1</i> ⁺
rum1-C2	ACTAACGACCAGCGTTTGT C	Comprobación de delección de <i>rum1</i> ⁺
ste9-D1	CAATTGACTCCTTCTTAATTCAATTGGTAAAATTAGC TAACGACATTTAATCGGTGAAGTCAGGGGGCCTAA CGTGA AATTCGGATCCCCGGGTTAATTAA	Delección de <i>ste9</i> ⁺
ste9-D2	AAAGAATGTTTCGTGTATGCACAATAAGTAAAAATC GTTGACCGAAATGAAAGCGACAAAGGTGTAATATTT TAGTAATAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Delección de <i>ste9</i> ⁺
ste9-C1	CGTGGATTGTA CTCTGTGTGC	Comprobación de delección de <i>ste9</i> ⁺
ste9-C2	GGTCAA ACTGT CACATTGCC	Comprobación de delección de <i>ste9</i> ⁺
rad3-D1	ATAAATGCTCAAGACTTTGAACGCGCGTGTTCGTT TTAAAAAGGCCTTTTTTTGAATTGAATCAATGGTTG ATATAGTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección de <i>rad3</i> ⁺
rad3-D2	TAATAAATAAAATATCTTCGATTCAAATCATAAGTTT AATAATGGGTAGCTTGTTCAATTGAAATTTTTGTTAGT AAAATGATCGATGAATTCGAGCTCG	Delección de <i>rad3</i> ⁺
rad3-C1	CTCGTTAATTAGCATCGCTCG	Comprobación de delección de <i>rad3</i> ⁺
rad3-C2	CGGATGATGACTCAGAAACAG	Comprobación de delección de <i>rad3</i> ⁺
spd1-D1	AAACGTCACAAAGCCGAGTAGCAAACGCTCCCACA ACCAAACACTACACAAAGGTTTCGTCGACAATTTATT TTGGAAAAACGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección de <i>spd1</i> ⁺
spd1-D2	TGAACGAAGGAATAATTGGA ACTATGAGGATTGGT GTCAAATTATCCTTAAAGAAGAGATATACGAGATTC ACATTTAGCATCGATGAATTCGAGCTCG	Delección de <i>spd1</i> ⁺
spd1-C1	TCCGTGTTTCGATAGGCATTC	Comprobación de delección de <i>spd1</i> ⁺
spd1-C2	ATCACTTAGCCGTCACTCAC	Comprobación de delección de <i>spd1</i> ⁺
kan-C1	AGCTGCGCAGTCAAGACTG	Comprobación de las delecciones
kan-C2	CAGATGCGAAGTTAAGTGCG	Comprobación de las delecciones

De esta forma se construyeron las delecciones de *rum1*⁺ y *ste9*⁺ sobre la mayoría de los fondos mutantes, así como las delecciones de *rad3*⁺ y *spd1*⁺.

5. Cruces genéticos

Para combinar diferentes mutaciones, se cruzaron cepas de tipo sexual opuesto con las mutaciones de interés en placas de MEA creciéndolas mezcladas durante 2 días a 25°C para que conjugaran y esporularan. En la mayor parte de los casos, las ascas se diseccionaron por micromanipulación. En primer lugar, se separaron ascas de forma ordenada utilizando un micromanipulador MSM 400 (Singer Instruments) sobre una placa de YES agar. Tras unas horas de incubación para que se abrieran las ascas, se separaron las esporas de cada una para analizar la segregación de los genes de interés en cada tétrada.

En los casos donde las cepas obtenidas tenían una muy baja viabilidad, se realizaron análisis de esporas al azar donde se trataron las ascas con la enzima glucosidasa (Sigma) 1:500 en 1 ml de agua destilada, que rompe la pared de las ascas y de las células vegetativas, pero no la de las esporas. A continuación, se sembraron las esporas en placas de YES agar.

Finalmente, en ambos casos se seleccionaron los clones de interés mediante réplicas en medios selectivos, por PCR o propiedades fenotípicas.

6. Ensayos de viabilidad en placa

Para comparar la tasa de crecimiento entre diferentes cepas de *S. pombe* en distintos medios o con HU, se realizaron ensayos de gotas de diluciones seriadas. Se recogió un volumen equivalente a 2×10^7 células de cultivos en fase exponencial y se resuspendió en 100 μ l de agua estéril. Se realizaron 5 diluciones seriadas 1:10 en un volumen final de 100 μ l y se sembraron 5 μ l de cada dilución con una micropipeta multicanal (Finnpipette, Thermo scientific). En algunos casos se sembró también la dilución más concentrada y en otros, sólo las 5 diluciones. Tras la siembra se incubaron las placas a 32°C y se observó el fenotipo a las 16 horas. Se tomaron fotografías de las células en monocapa. Éstas se realizaron en campo claro con un microscopio Olympus BX60 con cámara digital Olympus C-5050 acoplada y el objetivo LMPlanFI 40x/0,40 AN. Además, se escanearon las placas cada 24 horas y el crecimiento fue analizado hasta los 4 o 5 días.

Para el análisis del crecimiento en diferentes medios, los cultivos se crecieron en YES durante 24 horas y en MMGlu durante otras 24 horas. De los cultivos en MMGlu, se tomaron células para crecer en placas de YES, MM o MMF.

7. Inmunodetección de proteínas por *western blot*

7.1 Preparación de extractos proteicos en condiciones desnaturizantes de células de *S. pombe*

Se siguió un protocolo similar al descrito por Foiani *et al.* 1994 con ácido tricloroacético (TCA). Se recogieron 2×10^8 células de un cultivo en fase exponencial y se lavaron con 1ml de TCA al 20% frío. Se resuspendieron en un volumen final de 50

μl de TCA al 20% y se congelaron a -20°C. Para la extracción de proteínas, se descongelaron las células en hielo y se añadió un volumen equivalente a 500 μl de bolitas de vidrio (4mm, Sartorius). Posteriormente, se rompieron las células en una Fast-prep (Bio-101) con tres ciclos de 15 segundos a potencia 5,5. Luego, se añadieron 400 μl de TCA al 5% y se homogeneizó todo con el vórtex. Para eliminar las bolitas, se perforó el fondo del tubo con una aguja incandescente y se centrifugó el tubo sobre otro limpio durante 10 segundos a 7000 rpm en una centrífuga sin la tapa, para pasar el líquido al segundo tubo y dejar las bolitas en el primero. De nuevo, se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a 3000 rpm y se eliminó el sobrenadante. A continuación, el precipitado de proteínas se resuspendió en 200 μl de solución SDS-Tris base (60 μl de SDS 10%, 40 μl de Tris base 1M y 100 μl de agua destilada), se hirvió durante 5 minutos y se centrifugó 2 minutos a máxima velocidad. Finalmente, se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se mantuvieron congelados a -20°C.

7.2 Medida de la concentración de proteína en los extractos

Antes de congelar se separaron 5 μl del extracto total para determinar la concentración de proteína. Se utilizó el *kit Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Scientific) y se elaboró una recta patrón con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA). Mediante una reacción colorimétrica, se determinó la concentración de proteína a través de las absorbancias medidas en un espectrofotómetro HALO DB-20 a 562 nm.

7.3 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

La separación electroforética de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida de entre el 8-12% de concentración con una solución de acrilamida:bisacrilamida ratio 37,5:1 (Protogel 30%; National Diagnostics) y SDS. Se utilizaron persulfato amónico (BioRad) y TEMED (BioRad) como agentes polimerizantes. Una vez descongelados los extractos se hirvieron de nuevo y centrifugaron durante 2 minutos a máxima velocidad. Se prepararon los tubos con el volumen necesario de cada extracto para tener una cantidad de proteína total de entre 50 y 95 μg según cada caso, y se añadió SB 2x (Sample Buffer 2x: Tris-HCl 80 mM pH 6,8, DTT 5 mM, SDS 2%, glicerol 7,5 %, EDTA 5 mM y azul de bromofenol 0,002%) hasta completar un volumen de 15 μl totales. A continuación, se cargaron los geles y se realizó la carrera en cubetas Mini-Protean II (BioRad) con una solución de Tris HCl 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1% pH 8,3 como tampón. La carrera se llevó a cabo a un voltaje constante de 100 V durante los primeros minutos hasta que el frente entra en la parte inferior del gel y luego, a amperaje constante de 20 mA por cada gel. Se utilizó como marcador de peso molecular preteñido *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific). Además, la electroforesis se llevó a cabo en una cubeta con hielo.

7.4 Análisis por *western blot* en membranas de PVDF

Se transfirieron las proteínas desde el gel de electroforesis a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Immobilon-P, tamaño de poro 0,45 μm) en el mismo

tipo de cubetas empleadas para la electroforesis, empleando como tampón una solución CAPS 10 mM a pH 11 y etanol 10%. Se llevó a cabo a un amperaje constante de 320 mA durante 1 hora y 40 minutos o 2 horas y 15 minutos para proteínas de alto peso molecular. Se realizó en una cubeta con hielo a temperatura de ambiente para las transferencias de 1 hora y 40 minutos o en cámara fría de 4°C para las transferencias más largas. Una vez realizada la transferencia, se tiñeron las membranas con el colorante Ponceau (BioRad) durante 10 minutos para ver si las proteínas estaban adecuadamente transferidas y en algunos casos si la carga de los carriles era correcta. En este punto, las membranas se marcaron para cortar cuando fue necesario y se bloquearon durante al menos 1 hora a temperatura ambiente en solución TBS (Tris Base-NaCl) Tween 0,05% con leche 5% (Sveltesse, Nestlé). A continuación, se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios específicos para cada caso, en la solución TBS-Tween 0,05% con leche 5% o BSA 5% (Sigma-Aldrich) durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C según cada anticuerpo. Luego, se realizaron 3 lavados de 5 minutos en TBS-Tween 0,05% y se incubaron las membranas en el anticuerpo secundario correspondiente ligado a la peroxidasa de rábano para dar señal quimioluminiscente durante 45 minutos. Posteriormente, se realizaron otros tres lavados para eliminar el exceso de anticuerpo y se emplearon los kits de revelado Amersham (*ECL Western Blotting Detection reagents, GE Healthcare*) o Advansta (*Western Bright Quantum Western Blotting detection*). Finalmente, se expusieron las membranas durante distintos tiempos a películas de revelado (Agfa). Para el control de carga, se incubaron las membranas con el anticuerpo anti-TAT1.

7.5 Electroforesis y western blot de geles *Phos-tag*

Se utilizaron geles de *Phos-tag* para evaluar el estado de fosforilación de la proteína Cds1 en el mutante *rum1Δ ste9Δ*. El *Phos-tag* es un compuesto que se une específicamente a los grupos fosfato y se utiliza para la separación específica de proteínas fosforiladas por electroforesis porque retrasa la migración con respecto a la proteína sin fosforilar. Tras extraer las muestras de proteína y cuantificarlas de forma habitual, se realizaron geles con una mezcla de acrilamida:bisacrilamida 29:1 (BioRad), que se suplementó con *Phos-tag* (Wako Pure Chemical Industries) a una concentración final de 37,5 μM y con MnCl_2 a una concentración final de 75 μM . Se prepararon las muestras con un SB 2x sin EDTA y se separaron al menos con un carril vacío separando el marcador de peso molecular porque contiene EDTA que distorsiona la carrera de las proteínas al quelar el compuesto *Phos-tag*. Se cargó un total de 40 μg de proteína en un volumen final de 15 μl . La carrera se llevó a cabo a un voltaje constante de 100 V de la misma manera que los geles sin *Phos-tag*. Antes de realizar la transferencia, se incubaron los geles durante 10 minutos con la solución tamponada de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y etanol 10%) con EDTA 1 mM para quelar los geles y luego, se hicieron otros dos lavados con el mismo tampón sin EDTA. Finalmente, se prosigió con el protocolo habitual de *western blot*.

7.6 Anticuerpos utilizados

A continuación se detallan en la siguiente **Tabla 5** los anticuerpos utilizados y sus condiciones de uso.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para *western blot*

Anticuerpo	Organismo	Tipo	Dilución	Procedencia
anti-HA (12CA5)	Ratón	Monoclonal	1:5000	Roche
anti-Rum1 R4	Conejo	Policlonal	1:250	S. Moreno
anti-Ste9	Conejo	Policlonal	1:200	S. Moreno
anti-GFP	Ratón	Policlonal	1:1500	Molecular Probes
anti-TAT1 (tubulina)	Ratón	Monoclonal	1:10000	K. Gull

8. Microscopía de contraste interferencial (DIC) y fluorescencia

8.1 Microscopía de campo claro

Se utilizó un microscopio Olympus BX60 con objetivos LMPlanFI 20x, 10x y 4x para observar las células durante los experimentos y estudiar el crecimiento de colonias en placa. Para obtener imágenes se empleó una cámara digital Olympus C-5050 acoplada al microscopio.

8.2 Tinción de núcleos y septos con DAPI-Blankophor

Esta tinción se utilizó para visualizar los defectos mitóticos en las cepas *rad3Δ rum1Δ ste9Δ* y *ppa2Δ rum1Δ ste9Δ*. Para cada muestra se recogió un volumen de cultivo equivalente a un número total de 10^7 células. Tras centrifugar y realizar un lavado con agua destilada, las células se fijaron con 1 ml de etanol 70% frío y se guardaron a 4°C hasta el procesamiento. La tinción se llevó a cabo tomando 150 μ l de células fijadas, centrifugando y rehidratando las células con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 1,5 mM pH 7,2). A continuación, las células se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en 3 μ l DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol; Sigma) 0,1 mg/ml y 1,5 μ l de Blankophor (Bayer) 50 μ g/ml. Finalmente, se extendió la muestra sobre un portaobjetos y se observó al microscopio de fluorescencia.

Para capturar las imágenes de la doble tinción con DAPI-Blankophor se utilizó un microscopio Leica DM RXA equipado con un sistema de iluminación halógena y un equipo de fotografía digital (ORCA ER, Hamamatsu). Las imágenes fueron capturadas con el programa MetaMorph (Molecular Devices).

8.3 Medición del tamaño celular *in vivo* mediante tinción con Blankophor

Se utilizó un volumen de cultivo en fase exponencial equivalente a 2×10^6 células.

Las células se centrifugaron y se lavaron con PBS, se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron las células en 3,5 μ l de Blankophor 50 μ g/ml (Bayer). La muestra se extendió sobre un portaobjetos y se observó la tinción al microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i equipado con un sistema de iluminación halógena y un equipo de fotografía digital (ORCA ER, Hamamatsu). Las imágenes fueron capturadas con el programa MetaMorph (Molecular Devices). A continuación, se midió la longitud de 580-600 células del cultivo de forma aleatoria.

8.4 Visualización de las proteínas etiquetadas con epítopos fluorescentes Rad52-YFP y Tos4-GFP

Se recogieron las células de 500 μ l de cultivo en fase exponencial por centrifugación a 3000 rpm durante 2 minutos y se retiró casi todo el sobrenadante. Las células se resuspendieron en un volumen pequeño y se extendieron sobre un portaobjetos. Se colocó un cubreobjetos y se selló con esmalte. Finalmente, se observó al microscopio.

Para capturar las imágenes de la señal de Rad52-YFP se utilizó un equipo Personal DeltaVision (*Applied Precision*, LLC) controlado mediante el *software* SoftWoRx Resolve 3D. Las imágenes fueron tomadas con una cámara CoolSNAP HQ2 (Photometrics) acoplada al microscopio. Las imágenes que se muestran y las utilizadas para hacer los recuentos, corresponden a proyecciones máximas de 12 imágenes tomadas a distintos planos en z de 0,3 μ m de distancia entre ellos. Las fotos de fluorescencia fueron tomadas con el objetivo 60x y una exposición de 600 ms.

Para las fotos de la señal de Tos4-GFP se tiñeron también las células con Blankophor. Se utilizó el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i y una exposición de 500 ms.

9. Inmunofluorescencia para la detección de incorporación de BrdU

Para analizar el porcentaje de células que incorporan bromodesoxiuridina (BrdU), un nucleótido sintético análogo a la timidina, se utilizó una cepa que expresa la enzima timidina quinasa del virus herpes simplex (*hsv-tk⁺*) bajo un promotor reprimible por tiamina *P3nmt1, h⁺ ura4-D18::P3nmt1-Tk-ura4⁺*.

Se crecieron los cultivos hasta fase exponencial en medio mínimo sin tiamina. En cada tiempo, se apartó un volumen de cultivo equivalente a 5×10^7 células en un matraz envuelto en papel de aluminio y se añadió BrdU durante 10-20 minutos a una concentración final de 2,5 μ M a partir de un stock 25 μ M preparado antes de cada experimento. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron una vez con agua destilada y se fijaron en etanol al 70%. A continuación, las células se lavaron con PBS y se trataron con 1 ml de PBS con 0,5 mg/ml zymoliasa 20T durante 10 minutos en rotación para romper la pared. Las muestras se lavaron de nuevo y se trataron con 1 ml de HCl 2N y 0,1% Tritón durante 30 minutos para desnaturalizar el DNA. Luego, tras centrifugar y eliminar la solución de HCl, las muestras se

neutralizaron con una solución de tetraborato sódico 0,1 M a pH 9 durante 5 minutos. Después de realizar 4 lavados con PBS durante 5 minutos en rotación, las muestras se bloquearon con 1 ml de PBS y 10% de suero bovino fetal (FBS) durante 1h. Posteriormente, las muestras se incubaron con el anticuerpo de ratón anti BrdU 1:50 (BD) en 500 μ l de solución PBS 10% FBS y 0,05% Tween-20 durante toda la noche en oscuridad. Al día siguiente, tras tres lavados con PBS, las muestras se incubaron con el anticuerpo de cabra anti-ratón fluorescente Alexa Fluor 488 (Invitrogen) 1:250 en 250 μ l de solución PBS 10% FBS y 0,05% Tween-20. Finalmente, las muestras se lavaron, las células se inmovilizaron en portas excavados tratados con poli-L-lisina (Sigma) y se añadieron 10 μ l de medio de montaje Vectashield con DAPI (Sigma) antes de poner el cubreobjetos.

Las fotos de fluorescencia se realizaron en el microscopio Nikon Eclipse 90i y se utilizó una exposición de 300 ms para GFP. Se contaron 900-930 células para obtener el porcentaje de células positivas para BrdU.

10. Citometría de flujo de células de *S. pombe*

Mediante la técnica de citometría de flujo se analizó la distribución de las fases del ciclo celular y el tamaño. Se siguió el protocolo descrito por Sazer y Sherwood, 1990 y un método adaptado al descrito por Knutsen *et al.*, 2011.

Las células se fijaron de la misma manera que para la tinción con DAPI-Blankophor. Un volumen de 300 μ l de células fijadas se rehidrataron mediante dos lavados con el mismo volumen de citrato sódico 50 mM. Luego, se incubaron con RNasa 100 μ g/ml en 500 μ l de citrato sódico 50 mM a 37°C durante una noche. Al día siguiente, se tiñeron los núcleos con 500 μ l de una solución de yoduro de propidio 4 μ g/ μ l y citrato sódico 50 mM.

A continuación, las muestras se sonicaron durante 10 segundos a una amplitud de 50% con un sonicador Misonix XL2010. Finalmente, las muestras se examinaron en un citómetro FACSCalibur BD utilizando el programa de adquisición y análisis de datos BD Cell Quest Pro TM 6.0.3 (Biosciences). Para este estudio, se tuvieron en cuenta los parámetros de detección del contenido de DNA FL2-A y FL2-W y para el tamaño, FSC-H. El número de eventos contabilizado fue de 1×10^5 células.

11. Tratamiento informático y estadístico de los datos

11.1 Análisis de secuencias

Las secuencias de DNA y proteína se obtuvieron de las bases de datos Pombase (Wood *et al.*, 2012) y UniProt (<http://www.uniprot.org>). Se analizaron para la construcción de oligonucleótidos utilizando el programa EditSeq (DNASTAR Inc.).

11.2 Presentación de los datos y análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos obtenidos y obtención de gráficas se utilizaron

los programas Excel (Microsoft Office) y el paquete estadístico Prism 6 (GraphPad).

Tras comprobar que los datos del mutante *rum1Δ ste9Δ* se comportan con normalidad mediante un test de normalidad Kolmogorov-Smirnov, se analizaron las diferencias entre los mutantes mediante test t de Student en el caso de dos muestras, y test ANOVA con corrección múltiple de Tukey para la comparación entre varias cepas por cada medio. En el caso de la significación estadística de las RT-PCRs, se realizó test ANOVA con corrección múltiple de Holm-Sidak. Para la intensidad de señal Tos4-GFP y los focos de Rad52-YFP, se compararon las dos cepas mediante test t de Student por cada condición. Por tanto, se compararon los valores de las medias y cuando fue posible, se expresó la desviación estándar procedente de tres repeticiones experimentales. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a partir de un valor $p < 0,05$. Los distintos valores de significación en función del valor p se expresaron de la siguiente forma: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; *** para $p < 0,001$ y **** para $p < 0,0001$. Cuando la diferencia no fue significativa, se indicó n.s. (no significativas).

Para el tratamiento de las imágenes se utilizaron los programas ImageJ (NIH), SoftWoRx Resolve 3D y Adobe Photoshop CS5 (Adobe) y para las presentaciones gráficas, Keynote (Apple). Las películas de *western blot* y las placas del crecimiento de las gotas en diluciones seriadas se escanearon con el escáner HP Scanjet G4050. Las referencias bibliográficas se obtuvieron de la base de datos de acceso libre PubMed-NCBI y se gestionaron con Mendeley 1.15.2 (Elsevier). Para la maquetación y procesamiento de textos se utilizó Word 2011 (Microsoft Office).

Bibliografía

Anda, S., Rothe, C., Boye, E. & Grallert, B. Consequences of abnormal CDK activity in S phase. *Cell Cycle* **15**, 963–973 (2016).

Amon, A., Irniger, S. & Nasmyth, K. Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell* **77**, 1037–1050 (1994).

Ali Gianni, S. *et al.* The Fission Yeast Homeodomain Protein Yox1p Binds to MBF and Confines MBF-Dependent Cell-Cycle Transcription to G1-S via Negative Feedback. *PLoS Genet.* **5**, e1000626 (2009).

Álvarez, B., Blanco, M. A. & Moreno, S. The Fission Yeast APC Activator Ste9 is Regulated by mRNA Decay. *Cell Cycle* **5**, 865–868 (2006).

Alvarez, B. & Moreno, S. Fission yeast Tor2 promotes cell growth and represses cell differentiation. *J. Cell Sci.* **119**, 4475–4485 (2006).

Aoi, Y., Kawashima, S. A., Simanis, V., Yamamoto, M. & Sato, M. Optimization of the analogue-sensitive Cdc2/Cdk1 mutant by in vivo selection eliminates physiological limitations to its use in cell cycle analysis. *Open Biol.* **4**, 140063 (2014).

Ayté, J. *et al.* The *Schizosaccharomyces pombe* MBF complex requires heterodimerization for entry into S phase. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2589–2599 (1995).

Ayté, J., Leis, J. & DeCaprio, J. A. The fission yeast protein p73res2 is an essential component of the mitotic MBF complex and a master regulator of meiosis. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6246–6254 (1997).

Ayté, J., Schweitzer, C., Zarzov, P., Nurse, P. & DeCaprio, J. A. Feedback regulation of the MBF transcription factor by cyclin Cig2. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1043–1050 (2001).

Ayuda-Duran, P. *et al.* The CDK regulators Cdh1 and Sic1 promote efficient usage of DNA replication origins to prevent chromosomal instability at a chromosome arm. *Nucleic Acids Res.* **42**, 7057–7068 (2014).

Baber-Furnari, B. A. *et al.* Regulation of mitotic inhibitor Mik1 helps to enforce the DNA damage checkpoint. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1–11 (2000).

Bähler, J. *et al.* Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**, 943–951 (1998).

Bähler, J. Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 69–94 (2005).

Bailis, J. M., Luche, D. D., Hunter, T. & Forsburg, S. L. Minichromosome maintenance proteins interact with checkpoint and recombination proteins to promote s-phase genome stability. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 1724–1738 (2008).

Banyai, G., Baïdi, F., Coudreuse, D. & Szilagyi, Z. Cdk1 activity acts as a quantitative platform for coordinating cell cycle progression with periodic transcription. *Nat. Commun.* **7**, 11161 (2016).

Barberis, M. *et al.* The yeast cyclin-dependent kinase inhibitor Sic1 and mammalian p27^{Kip1} are functional homologues with a structurally conserved inhibitory domain. *Biochem. J.* **387**, 639–647 (2005).

Barnum, K. J. & O’Connell, M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol. Biol.* **1170**, 29–40 (2014).

Bashir, T., Dorrello, N. V., Amador, V., Guardavaccaro, D. & Pagano, M. Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature* **428**, 190–193 (2004).

Baum, B., Wuarin, J. & Nurse, P. Control of S-phase periodic transcription in the fission yeast mitotic cycle. *EMBO J.* **16**, 4676–4688 (1997).

Baum B., Nishitani H., Yanow S. & Nurse P. Cdc18 transcription and proteolysis couple S phase to passage through mitosis. *EMBO J.* **17**, 5689–5698 (1998).

Beck, H. *et al.* Cyclin-Dependent Kinase Suppression by WEE1 Kinase Protects the Genome through Control of Replication Initiation and Nucleotide Consumption. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 4226–4236 (2012).

Bell, S. & Dutta, A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 333–374 (2002).

Benito, J., Martín-Castellanos, C. & Moreno, S. Regulation of the G1 phase of the cell cycle by periodic stabilization and degradation of the p25rum1 CDK inhibitor. *EMBO J.* **17**, 482–497 (1998).

Bertoli, C., Skotheim, J. M. & de Bruin, R. A. M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 518–528 (2013). **A**

Bertoli, C., Klier, S., McGowan, C., Wittenberg, C. & de Bruin, R. A. M. Chk1 inhibits E2F6 repressor function in response to replication stress to maintain cell-cycle transcription. *Curr. Biol.* **23**, 1629–1637 (2013). **B**

Bertoli, C., Herlihy, A. E., Pennycook, B. R., Kriston-Vizi, J. & de Bruin, R. A. M. Sustained E2F-Dependent Transcription Is a Key Mechanism to Prevent Replication-Stress-Induced DNA Damage. *Cell Rep.* **15**, 1412–1422 (2016).

Blanco, M. A., Sánchez-Díaz, A., de Prada, J. M. & Moreno, S. APC(ste9/srw1) promotes degradation of mitotic cyclins in G(1) and is inhibited by cdc2 phosphorylation. *EMBO J.* **19**, 3945–3955 (2000).

Boddy, M. N., Furnari, B., Mondesert, O. & Russell, P. Replication checkpoint enforced by kinases Cds1 and Chk1. *Science* **280**, 909–912 (1998).

Boddy, M. N. *et al.* Damage tolerance protein Mus81 associates with the FHA1 domain of checkpoint kinase Cds1. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8758–8766 (2000).

- Booher, R. N., Deshaies, R. J. & Kirschner, M. W. Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *EMBO J.* **12**, 3417–3426 (1993).
- Brandeis, M. & Hunt, T. The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *EMBO J.* **15**, 5280–5289 (1996).
- Brondello, J. M., Boddy, M. N., Furnari, B. & Russell, P. Basis for the checkpoint signal specificity that regulates Chk1 and Cds1 protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4262–4269 (1999).
- Bruck, I., Perez-Arnaiz, P., Colbert, M. K. & Kaplan, D. L. Insights into the Initiation of Eukaryotic DNA Replication. *Nucleus* **6**, 449–454 (2015).
- Bontron, S. *et al.* Yeast endosulfines control entry into quiescence and chronological life span by inhibiting protein phosphatase 2A. *Cell Rep.* **3**, 16–22 (2013).
- Bueno, A., Richardson, H., Reed, S. I. & Russell, P. A fission yeast B-type cyclin functioning early in the cell cycle. *Cell* **66**, 149–159 (1991).
- Bueno, A. & Russell, P. Two fission yeast B-type cyclins, cig2 and Cdc13, have different functions in mitosis. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2286–2297 (1993).
- Caetano, C., Klier, S. & de Bruin, R. A. M. Phosphorylation of the MBF Repressor Yox1p by the DNA Replication Checkpoint Keeps the G1/S Cell-Cycle Transcriptional Program Active. *PLoS One* **6**, e17211 (2011).
- Caetano, C. *et al.* Tolerance of deregulated G1/S transcription depends on critical G1/S regulon genes to prevent catastrophic genome instability. *Cell Rep.* **9**, 2279–2289 (2014).
- Caligiuri, M. & Beach, D. Sct1 functions in partnership with Cdc10 in a transcription complex that activates cell cycle START and inhibits differentiation. *Cell* **72**, 607–619 (1993).
- Campbell, S. D., Sprenger, F., Edgar, B. A. & O'Farrell, P. H. Drosophila Wee1 kinase rescues fission yeast from mitotic catastrophe and phosphorylates Drosophila Cdc2 in vitro. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1333–1347 (1995).
- Capasso, H. *et al.* Phosphorylation activates Chk1 and is required for checkpoint-mediated cell cycle arrest. *J. Cell Sci.* **115**, 4555–4564 (2002).
- Caspari, T. & Carr, A. M. DNA structure checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimie* **81**, 173–181 (1999).
- Caspari, T. & Carr, A. M. Checkpoints: how to flag up double-strand breaks. *Curr. Biol.* **12**, 105–107 (2002).
- Chen, H. Z., Tsai, S. Y. & Leone, G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 785–797 (2009).
- Chen, S. & Bell, S. P. CDK prevents Mcm2-7 helicase loading by inhibiting Cdt1 interaction with Orc6. *Genes Dev.* **25**, 363–372 (2011).
- Chica, N. *et al.* Nutritional Control of Cell Size by the Greatwall-Endosulfine-PP2A-B55 Pathway. *Curr. Biol.* **26**, 319–330 (2016).
- Christensen, P. U., Bentley, N. J., Martinho, R. G., Nielsen, O. & Carr, A. M. Mik1 levels accumulate in S phase and may mediate an intrinsic link between S phase and mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2579–2584 (2000).

Chu, Z. *et al.* Modulation of Cell Cycle-specific Gene Expressions at the Onset of S Phase Arrest Contributes to the Robust DNA Replication Checkpoint Response in Fission Yeast. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1756–1767 (2007).

Chu, Z., Eshaghi, M., Poon, S. Y. & Liu, J. A Cds1-mediated checkpoint protects the MBF activator Rep2 from ubiquitination by anaphase-promoting complex/cyclosome-Ste9 at S-phase arrest in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4959–4970 (2009).

Ciccia, A. & Elledge, S. J. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol. Cell* **40**, 179–204 (2010).

Cohen, A., Kupiec, M. & Weisman, R. Glucose Activates TORC2-Gad8 Protein via Positive Regulation of the cAMP/cAMP-dependent Protein Kinase A (PKA) Pathway and Negative Regulation of the Pmk1 Protein-Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. *J. Biol. Chem.* **289**, 21727–21737 (2014).

Cohen, A., Kupiec, M. & Weisman, R. Gad8 Protein Is Found in the Nucleus Where It Interacts with the MluI Cell Cycle Box-binding Factor (MBF) Transcriptional Complex to Regulate the Response to DNA Replication Stress. *J. Biol. Chem.* **291**, 9371–9381 (2016).

Connolly, T. & Beach, D. Interaction between the Cig1 and Cig2 B-type cyclins in the fission yeast cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 768–776 (1994).

Connolly, T., Caligiuri, M. & Beach, D. The Cdc2 protein kinase controls Cdc10/Sct1 complex formation. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1105–1115 (1997).

Correa-Bordes, J., Gulli, M. P. & Nurse, P. p25^{rum1} promotes proteolysis of the mitotic B-cyclin p56^{cdc13} during G1 of the fission yeast cell cycle. *EMBO J.* **16**, 4657–4664 (1997).

Costello, G., Rodgers, L. & Beach, D. Fission yeast enters the stationary phase G0 state from either mitotic G1 or G2. *Curr. Genet.* **11**, 119–125 (1986).

Coudreuse, D. & Nurse, P. Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature* **468**, 1074–1079 (2010).

Cueille, N. *et al.* Fip1, a fission yeast orthologue of the *S. cerevisiae* CDC14 gene, is not required for cyclin degradation or rum1p stabilisation at the end of mitosis. *J. Cell Sci.* **114**, 2649–2664 (2001).

Daga, R. R., Bolaños, P. & Moreno, S. Regulated mRNA Stability of the Cdk Inhibitor Rum1 Links Nutrient Status to Cell Cycle Progression. *Curr. Biol.* **13**, 2015–2024 (2003).

Davie, E. & Petersen, J. Environmental control of cell size at division. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 838–844 (2012).

de Bruin, R. A. M. *et al.* Constraining G1-Specific Transcription to Late G1 Phase: The MBF-Associated Corepressor Nrm1 Acts via Negative Feedback. *Mol. Cell* **23**, 483–496 (2006).

de Bruin, R. A. *et al.* DNA replication checkpoint promotes G1-S transcription by inactivating the MBF repressor Nrm1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 11230–11235 (2008).

Dimova, D. K. & Dyson, N. J. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* **24**, 2810–2826 (2005).

- Domínguez-Kelly, R. *et al.* Wee1 controls genomic stability during replication by regulating the Mus81-Eme1 endonuclease. *J. Cell Biol.* **194**, 567–579 (2011).
- Drury, L. S., Perkins, G. & Diffley, J. F. The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast. *EMBO J.* **16**, 5966–5976 (1997).
- Dutta, C. *et al.* The DNA Replication Checkpoint Directly Regulates MBF-Dependent G1/S Transcription. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 5977–5985 (2008).
- Dutta, C. & Rhind, N. The role of specific checkpoint-induced S-phase transcripts in resistance to replicative stress. *PLoS One* **4**, e6944 (2009).
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D. & Hunt, T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389–396 (1983).
- Fabrizio, P. & Longo, V. D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* **2**, 73–81 (2003).
- Fantes, P. & Nurse, P. Control of cell size at division in fission yeast by a growth-modulated size control over nuclear division. *Exp. Cell Res.* **107**, 377–386 (1977).
- Fantes, P. A. Control of cell size and cycle time in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **24**, 51–67 (1977).
- Fernandez Sarabia, M. J., McInerney, C., Harris, P., Gordon, C. & Fantes, P. The cell cycle genes *cdc22+* and *suc22+* of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* encode the large and small subunits of ribonucleotide reductase. *Mol. Gen. Genet.* **238**, 241–251 (1993).
- Featherstone, C. & Russell, P. Fission yeast p107wee1 mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase. *Nature* **349**, 808–811 (1991).
- Fisher, D. & Nurse, P. Cyclins of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Semin. Cell Biol.* **6**, 73–78 (1995).
- Fisher, D. L. & Nurse, P. A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *EMBO J.* **15**, 850–860 (1996).
- Fleck, O. *et al.* Spd1 accumulation causes genome instability independently of ribonucleotide reductase activity but functions to protect the genome when deoxynucleotide pools are elevated. *J. Cell Sci.* **126**, 4985–4994 (2013).
- Foiani, M., Marini, F., Gamba, D., Lucchini, G. & Plevani, P. The B subunit of the DNA polymerase alpha-primase complex in *Saccharomyces cerevisiae* executes an essential function at the initial stage of DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 923–933 (1994).
- Forsburg, S. L. & Nurse, P. Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 227–256 (1991).
- Forsburg, S. L. Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 109–131 (2004).
- Forsburg, S. L. The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. *Gravit. Space Biol. Bull.* **18**, 3–9 (2005).

- Fukushima, H. *et al.* SCF-Mediated Cdh1 Degradation Defines a Negative Feedback System that Coordinates Cell-Cycle Progression. *Cell Rep.* **4**, 803–816 (2013).
- Fukuura, M. *et al.* CDK promotes interactions of Sld3 and Drc1 with Cut5 for initiation of DNA replication in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **22**, 2620–2633 (2011).
- Furnari, B., Blasina, A., Boddy, M. N., McGowan, C. H. & Russell, P. Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1. *Mol. Biol. Cell* **10**, 833–845 (1999).
- Furuya, K. & Carr, A. M. DNA checkpoints in fission yeast. *J. Cell Sci.* **116**, 3847–3848 (2003).
- Gambus, A. *et al.* GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat. Cell Biol.* **8**, 358–366 (2006).
- García-Higuera, I. *et al.* Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1. *Nat. Cell Biol.* **10**, 802–811 (2008).
- Ge, X. Q., Jackson, D. A. & Blow, J. J. Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are required for human cells to survive replicative stress. *Genes Dev.* **21**, 3331–3341 (2007).
- Glotzer, M., Murray, A. W. & Kirschner, M. W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132–138 (1991).
- Gomez-Escoda, B. *et al.* Yox1 links MBF-dependent transcription to completion of DNA synthesis. *EMBO Rep* **12**, 84–89 (2011).
- Gould, K. L., Moreno, S., Owen, D. J., Sazer, S. & Nurse, P. Phosphorylation at Thr167 is required for *Schizosaccharomyces pombe* p34cdc2 function. *EMBO J.* **10**, 3297–3309 (1991).
- Gould, K. L. & Nurse, P. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**, 39–45 (1989).
- Guarino, E. *et al.* Cdt1 proteolysis is promoted by dual PIP degrons and is modulated by PCNA ubiquitylation. *Nucleic Acids Res.* **39**, 5978–5990 (2011).
- Hagan, I., Hayles, J. & Nurse, P. Cloning and sequencing of the cyclin-related cdc13+ gene and a cytological study of its role in fission yeast mitosis. *J. Cell Sci.* **91**, 587–595 (1988).
- Håkansson, P., Dahl, L., Chilkova, O., Domkin, V. & Thelander, L. The *Schizosaccharomyces pombe* replication inhibitor Spd1 regulates ribonucleotide reductase activity and dNTPs by binding to the large Cdc22 subunit. *J. Biol. Chem.* **281**, 1778–1783 (2006).
- Hartwell, L. H. & Weinert, T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**, 629–634 (1989).
- Hatano, T., Morigasaki, S., Tatebe, H., Ikeda, K. & Shiozaki, K. Fission yeast Ryh1 GTPase activates TOR Complex 2 in response to glucose. *Cell Cycle* **14**, 848–856 (2015).
- Havens, C. G. & Walter, J. C. Mechanism of CRL4(Cdt2), a PCNA-dependent E3 ubiquitin ligase. *Genes Dev.* **25**, 1568–1582 (2011).

- Hayles, J., Fisher, D., Woollard, A. & Nurse, P. Temporal order of S phase and mitosis in fission yeast is determined by the state of the p34cdc2-mitotic B cyclin complex. *Cell* **78**, 813–822 (1994).
- Heichinger, C., Penkett, C. J., Bähler, J. & Nurse, P. Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins. *EMBO J.* **25**, 5171–5179 (2006).
- Hentges, P., Van Driessche, B., Tafforeau, L., Vandenhaute, J. & Carr, A. M. Three novel antibiotic marker cassettes for gene disruption and marker switching in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **22**, 1013–1019 (2005).
- Hills, S. A. & Diffley, J. F. X. DNA Replication and Oncogene-Induced Replicative Stress. *Curr. Biol.* **24**, 435–444 (2014).
- Hofmann, J. F. & Beach, D. cdt1 is an essential target of the Cdc10/Sct1 transcription factor: requirement for DNA replication and inhibition of mitosis. *EMBO J.* **13**, 425–434 (1994).
- Holmberg, C. *et al.* Ddb1 controls genome stability and meiosis in fission yeast. *Genes Dev.* **19**, 853–862 (2005).
- Homesley, L. *et al.* Mcm10 and the MCM2-7 complex interact to initiate DNA synthesis and to release replication factors from origins. *Genes Dev.* **14**, 913–926 (2000).
- Ikeda, K., Morigasaki, S., Tatebe, H., Tamanoi, F. & Shiozaki, K. Fission yeast TOR complex 2 activates the AGC-family Gad8 kinase essential for stress resistance and cell cycle control. *Cell Cycle* **7**, 358–364 (2008).
- Ilves, I., Petojevic, T., Pesavento, J. J. & Botchan, M. R. Activation of the MCM2-7 Helicase by Association with Cdc45 and GINS Proteins. *Mol. Cell* **37**, 247–258 (2010).
- Inoue, Y., Kitagawa, M. & Taya, Y. Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F-1 after DNA damage. *EMBO J.* **26**, 2083–2093 (2007).
- Ivanova, T., Gómez-Escoda, B., Hidalgo, E. & Ayté, J. G1/S transcription and the DNA synthesis checkpoint: common regulatory mechanisms. *Cell Cycle* **10**, 912–915 (2011).
- Ivanova, T. *et al.* The DNA damage and the DNA replication checkpoints converge at the MBF transcription factor. *Mol. Biol. Cell* **24**, 3350–3357 (2013).
- Jallepalli, P. V., Brown, G. W., Muzi-Falconi, M., Tien, D. & Kelly, T. J. Regulation of the replication initiator protein p65cdc18 by CDK phosphorylation. *Genes Dev.* **11**, 2767–2779 (1997).
- Jallepalli, P. V. & Kelly, T. J. Rum1 and Cdc18 link inhibition of cyclin-dependent kinase to the initiation of DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.* **10**, 541–552 (1996).
- Jallepalli, P. V., Tien, D. & Kelly, T. J. sud1(+) targets cyclin-dependent kinase-phosphorylated Cdc18 and Rum1 proteins for degradation and stops unwanted diploidization in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 8159–8164 (1998).
- Jaspersen, S. L., Charles, J. F. & Morgan, D. O. Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr. Biol.* **9**, 227–236 (1999).
- Jeffrey, P. D. *et al.* Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**, 313–320 (1995).

Jones, R. M. *et al.* Increased replication initiation and conflicts with transcription underlie Cyclin E-induced replication stress. *Oncogene* **32**, 3744–3753 (2013).

Kai, M., Boddy, M. N., Russell, P. & Wang, T. S. F. Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress. *Genes Dev.* **19**, 919–932 (2005).

Kanke, M., Kodama, Y., Takahashi, T. S., Nakagawa, T. & Masukata, H. Mcm10 plays an essential role in origin DNA unwinding after loading of the CMG components. *EMBO J.* **31**, 2182–2194 (2012).

Kawai, M. *et al.* Fission yeast *tor1* functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. *Curr. Genet.* **39**, 166–174 (2001).

Kelly, T. J. *et al.* The fission yeast *cdc18+* gene product couples S phase to START and mitosis. *Cell* **74**, 371–382 (1993).

Kiang, L., Heichinger, C., Watt, S., Bähler, J. & Nurse, P. Cyclin-dependent kinase inhibits reinitiation of a normal S-phase program during G2 in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4025–4032 (2009).

Kim, S. H., Lin, D. P., Matsumoto, S., Kitazono, A. & Matsumoto, T. Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science* **279**, 1045–1047 (1998).

Kinoshita, K. *et al.* The regulatory subunits of fission yeast protein phosphatase 2A (PP2A) affect cell morphogenesis, cell wall synthesis and cytokinesis. *Genes Cells* **1**, 29–45 (1996).

Kitagawa, M. *et al.* The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2. *EMBO J.* **15**, 7060–7069 (1996).

Kitamura, K., Maekawa, H. & Shimoda, C. Fission yeast Ste9, a homolog of Hct1/Cdh1 and Fizzy-related, is a novel negative regulator of cell cycle progression during G1-phase. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1065–1080 (1998).

Knutsen, J. H. J. *et al.* Cell-Cycle Analysis of Fission Yeast Cells by Flow Cytometry. *PLoS One* **6**, e17175 (2011).

Kohda, T. A. *et al.* Fission yeast autophagy induced by nitrogen starvation generates a nitrogen source that drives adaptation processes. *Genes to Cells* **12**, 155–170 (2007).

Kominami, K., Ochotorena, I. & Toda, T. Two F-box/WD-repeat proteins Pop1 and Pop2 form hetero- and homo-complexes together with cullin-1 in the fission yeast SCF (Skp1-Cullin-1-F-box) ubiquitin ligase. *Genes Cells* **3**, 721–735 (1998).

Kominami, K. & Toda, T. Fission yeast WD-repeat protein pop1 regulates genome ploidy through ubiquitin-proteasome-mediated degradation of the CDK inhibitor Rum1 and the S-phase initiator Cdc18. *Genes Dev.* **11**, 1548–1560 (1997).

Kramer, E. R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A. V., Mann, M. & Peters, J. M. Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1555–1569 (2000).

Kushner SR. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI derived plasmids. In: *Genetic Engineering* (eds H.B. Boyer, S. Nicosia) pp. 17-23. (1978).

- Langerak, P., Mejia-Ramirez, E., Limbo, O. & Russell, P. Release of Ku and MRN from DNA ends by Mre11 nuclease activity and Ctp1 is required for homologous recombination repair of double-strand breaks. *PLoS Genet.* **7**, e1002271 (2011).
- Lee, K. M., Saiz, J. E., Barton, W. A. & Fisher, R. P. Cdc2 activation in fission yeast depends on Mcs6 and Csk1, two partially redundant Cdk-activating kinases (CAKs). *Curr. Biol.* **9**, 441–444 (1999).
- Lee, K. Y. *et al.* Phosphorylation of ORC2 protein dissociates origin recognition complex from chromatin and replication origins. *J. Biol. Chem.* **287**, 11891–11898 (2012).
- Lee, M. S., Enoch, T. & Piwnicka-Worms, H. mik1+ encodes a tyrosine kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *J. Biol. Chem.* **269**, 30530–30537 (1994).
- Lengronne, A. & Schwob, E. The yeast CDK inhibitor Sic1 prevents genomic instability by promoting replication origin licensing in late G(1). *Mol. Cell* **9**, 1067–1078 (2002).
- Limbo, O., Porter-Goff, M. E., Rhind, N. & Russell, P. Mre11 nuclease activity and Ctp1 regulate Chk1 activation by Rad3ATR and Tel1ATM checkpoint kinases at double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 573–583 (2011).
- Lindsay, H. D. *et al.* S-phase-specific activation of Cds1 kinase defines a subpathway of the checkpoint response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.* **12**, 382–395 (1998).
- Liu, C. *et al.* Cop9/signalosome subunits and Pcu4 regulate ribonucleotide reductase by both checkpoint-dependent and -independent mechanisms. *Genes Dev.* **17**, 1130–1140 (2003).
- Liu, C. *et al.* Transactivation of *Schizosaccharomyces pombe* cdt2 β stimulates a Pcu4–Ddb1–CSN ubiquitin ligase. *EMBO J.* **24**, 3940–3951 (2005).
- Liu, E., Li, X., Yan, F., Zhao, Q. & Wu, X. Cyclin-dependent kinases phosphorylate human Cdt1 and induce its degradation. *J. Biol. Chem.* **279**, 17283–17288 (2004).
- Liu, P. *et al.* Replication licensing promotes cyclin D1 expression and G1 progression in untransformed human cells. *Cell Cycle* **8**, 125–136 (2009).
- Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O. & Russell, P. Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* **397**, 172–175 (1999).
- Lopez-Girona, A., Mondesert, O., Leatherwood, J. & Russell, P. Negative regulation of Cdc18 DNA replication protein by Cdc2. *Mol. Biol. Cell* **9**, 63–73 (1998).
- Lorca, T. & Castro, A. The Greatwall kinase: a new pathway in the control of the cell cycle. *Oncogene* **32**, 537–543 (2013).
- Lowndes, N. F., McInerney, C. J., Johnson, A. L., Fantes, P. A. & Johnston, L. H. Control of DNA synthesis genes in fission yeast by the cell-cycle gene cdc10+. *Nature* **355**, 449–453 (1992).
- Lundgren, K. *et al.* mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* **64**, 1111–1122 (1991).
- Machida, Y. J., Teer, J. K. & Dutta, A. Acute Reduction of an Origin Recognition Complex (ORC) Subunit in Human Cells Reveals a Requirement of ORC for Cdk2 Activation. *J. Biol. Chem.* **280**, 27624–27630 (2005).

Madrid, M. *et al.* Multiple crosstalk between TOR and the cell integrity MAPK signaling pathway in fission yeast. *Sci. Rep.* **6**, 37515 (2016).

Mahajan, K., Fang, B., Koomen, J. M. & Mahajan, N. P. H2B Tyr37 phosphorylation suppresses expression of replication-dependent core histone genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 930–937 (2012).

Mahyous Saeyd, S. A., Ewert-Krzemieniewska, K., Liu, B. & Caspari, T. Hyperactive Cdc2 kinase interferes with the response to broken replication forks by trapping *S.pombe* Crb2 in its mitotic T215 phosphorylated state. *Nucleic Acids Res.* **42**, 7734–7747 (2014).

Malumbres, M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* **15**, 122 (2014).

Maqbool, Z., Kersey, P. J., Fantes, P. A. & McInerny, C. J. MCB-mediated regulation of cell cycle-specific *cdc22+* transcription in fission yeast. *Mol. Genet. Genomics* **269**, 765–775 (2003).

Martín-Castellanos, C., Blanco, M. A., de Prada, J. M. & Moreno, S. The *puc1* cyclin regulates the G1 phase of the fission yeast cell cycle in response to cell size. *Mol. Biol. Cell* **11**, 543–554 (2000).

Martin-Castellanos, C., Labib, K. & Moreno, S. B-type cyclins regulate G1 progression in fission yeast in opposition to the *p25rum1* cdk inhibitor. *EMBO J.* **15**, 839–849 (1996).

Martín, R. *et al.* A PP2A-B55-Mediated Crosstalk between TORC1 and TORC2 Regulates the Differentiation Response in Fission Yeast. *Curr. Biol.* **27**, 175–188 (2017).

Martin, S. G. & Berthelot-Grosjean, M. Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle. *Nature* **459**, 852–856 (2009).

Martín, Y., Domínguez-Kelly, R. & Freire, R. Novel insights into maintaining genomic integrity: Wee1 regulating Mus81/Eme1. *Cell Div.* **6**, 21 (2011).

Mata, J. & Bähler, J. Global roles of Ste11p, cell type, and pheromone in the control of gene expression during early sexual differentiation in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 15517–22 (2006).

Matsuo, T., Otsubo, Y., Urano, J., Tamanoi, F. & Yamamoto, M. Loss of the TOR Kinase Tor2 Mimics Nitrogen Starvation and Activates the Sexual Development Pathway in Fission Yeast. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3154–3164 (2007).

McGowan, C. H. & Russell, P. Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J.* **12**, 75–85 (1993).

McInerny, C. J., Kersey, P. J., Creanor, J. & Fantes, P. A. Positive and negative roles for *cdc10* in cell cycle gene expression. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4761–4768 (1995).

Meister, P. *et al.* Temporal separation of replication and recombination requires the intra-S checkpoint. *J. Cell Biol.* **168**, 537–544 (2005).

Melixetian, M. *et al.* Loss of Geminin induces rereplication in the presence of functional p53. *J. Cell Biol.* **165**, 473–482 (2004).

Millar, J. B., McGowan, C. H., Lenaers, G., Jones, R. & Russell, P. p80cdc25 mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34cdc2 kinase in fission yeast. *EMBO J.* **10**, 4301–4309 (1991).

- Millar, J. B., Buck, V. & Wilkinson, M. G. Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev.* **9**, 2117–2130 (1995).
- Miyamoto, M., Tanaka, K. & Okayama, H. *res2+*, a new member of the *cdc10* family, controls the 'start' of mitotic and meiotic cycles in fission yeast. *EMBO J.* **13**, 1873–1880 (1994).
- Mochida, S., Rata, S., Hino, H., Nagai, T. & Novák, B. Two Bistable Switches Govern M Phase Entry. *Curr. Biol.* **26**, 3361–3367 (2016).
- Moreno, S., Klar, A. & Nurse, P. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **194**, 795–823 (1991).
- Moreno, S., Nurse, P. & Russell, P. Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80cdc25 mitotic inducer in fission yeast. *Nature* **344**, 549–552 (1990).
- Moreno, S. & Nurse, P. Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the *rum1+* gene. *Nature* **367**, 236–242 (1994).
- Moreno-Torres, M., Jaquenoud, M. & De Virgilio, C. TORC1 controls G1–S cell cycle transition in yeast via Mpk1 and the greatwall kinase pathway. *Nat. Commun.* **6**, 1–10 (2015).
- Morgan, D. O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 261–291 (1997).
- Moseley, J. B., Mayeux, A., Paoletti, A. & Nurse, P. A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature* **459**, 857–860 (2009).
- Moser, B. A. & Russell, P. Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 631–636 (2000).
- Moss, J. *et al.* Break-induced ATR and Ddb1-Cul4(Cdt)² ubiquitin ligase-dependent nucleotide synthesis promotes homologous recombination repair in fission yeast. *Genes Dev.* **24**, 2705–2716 (2010).
- Muris, D. F. *et al.* Homologous recombination in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: different requirements for the *rhp51+*, *rhp54+* and *rad22+* genes. *Curr. Genet.* **31**, 248–254 (1997).
- Nakamura, T. M., Moser, B. A. & Russell, P. Telomere binding of checkpoint sensor and DNA repair proteins contributes to maintenance of functional fission yeast telomeres. *Genetics* **161**, 1437–1452 (2002).
- Nakashima, N., Tanaka, K., Sturm, S. & Okayama, H. Fission yeast Rep2 is a putative transcriptional activator subunit for the cell cycle 'start' function of Res2-Cdc10. *EMBO J.* **14**, 4794–4802 (1995).
- Nasmyth, K., Nurse, P. & Fraser, R. S. The effect of cell mass on the cell cycle timing and duration of S-phase in fission yeast. *J. Cell Sci.* **39**, 215–233 (1979).
- Nevis, K. R., Cordeiro-Stone, M. & Cook, J. G. Origin licensing and p53 status regulate Cdk2 activity during G(1). *Cell Cycle* **8**, 1952–1963 (2009).
- Ng, S. S., Anderson, M., White, S. & McNerny, C. J. *mik1(+)* G1-S transcription regulates mitotic entry in fission yeast. *FEBS Lett.* **503**, 131–134 (2001).
- Nguyen, V. Q., Co, C., Irie, K. & Li, J. J. Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7. *Curr. Biol.* **10**, 195–205 (2000).

Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T. & Nurse, P. The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* **404**, 625–628 (2000).

Nishitani, H. & Nurse, P. p65cdc18 plays a major role controlling the initiation of DNA replication in fission yeast. *Cell* **83**, 397–405 (1995).

Noguchi, E., Shanahan, P., Noguchi, C. & Russell, P. CDK phosphorylation of Drc1 regulates DNA replication in fission yeast. *Curr. Biol.* **12**, 599–605 (2002).

Novak, B., Tyson, J. J., Gyorffy, B. & Csikasz-Nagy, A. Irreversible cell-cycle transitions are due to systems-level feedback. *Nat. Cell Biol.* **9**, 724–728 (2007).

Nurse, P. Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* **256**, 547–51 (1975).

Nurse, P. Checkpoint pathways come of age. *Cell* **91**, 865–867 (1997).

Nurse, P., Thuriaux, P. & Nasmyth, K. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* **146**, 167–178 (1976).

Nurse, P. & Thuriaux, P. Controls over the timing of DNA replication during the cell cycle of fission yeast. *Exp. Cell Res.* **107**, 365–375 (1977).

Obara-Ishihara, T. & Okayama, H. A B-type cyclin negatively regulates conjugation via interacting with cell cycle 'start' genes in fission yeast. *EMBO J.* **13**, 1863–1872 (1994).

O'Connell, M. J., Raleigh, J. M., Verkade, H. M. & Nurse, P. Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J.* **16**, 545–554 (1997).

O'Connell, M. J., Walworth, N. C. & Carr, A. M. The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol.* **10**, 296–303 (2000).

Okuno, Y., Satoh, H., Sekiguchi, M. & Masukata, H. Clustered adenine/thymine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6699–6709 (1999).

Otsubo, Y. & Yamamoto, M. TOR Signaling in Fission Yeast. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **43**, 277–283 (2008).

Pan, X. *et al.* Identification of novel genes involved in DNA damage response by screening a genome-wide *Schizosaccharomyces pombe* deletion library. *BMC Genomics* **13**, 662 (2012).

Peng, X. *et al.* Identification of Cell Cycle-regulated Genes in Fission Yeast. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1026–1042 (2005).

Petersen, B. O., Lukas, J., Sørensen, C. S., Bartek, J. & Helin, K. Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J.* **18**, 396–410 (1999).

Petersen, J. & Hagan, I. M. Polo kinase links the stress pathway to cell cycle control and tip growth in fission yeast. *Nature* **435**, 507–512 (2005).

Petersen, J. & Nurse, P. TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1263–1272 (2007).

Pfister, S. *et al.* Inhibiting WEE1 Selectively Kills Histone H3K36me3-Deficient Cancers by dNTP Starvation. *Cancer Cell* **28**, 557–568 (2015).

- Pfleger, C. M., & Kirschner, M. W. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes & Development* **14**, 655–665 (2000).
- Purtill, F. S. *et al.* A homeodomain transcription factor regulates the DNA replication checkpoint in yeast. *Cell Cycle* **10**, 664–670 (2011).
- Ralph, E., Boye, E. & Kearsley, S. E. DNA damage induces Cdt1 proteolysis in fission yeast through a pathway dependent on Cdt2 and Ddb1. *EMBO Rep.* **7**, 1134–1139 (2006).
- Reymond, A., Marks, J. & Simanis, V. The activity of *S.pombe* DSC-1-like factor is cell cycle regulated and dependent on the activity of p34cdc2. *EMBO J.* **12**, 4325–4334 (1993).
- Rhind, N. & Russell, P. Checkpoints: it takes more than time to heal some wounds. *Curr. Biol.* **10**, 908–911 (2000).
- Rhind, N. & Russell, P. Roles of the mitotic inhibitors Wee1 and Mik1 in the G(2) DNA damage and replication checkpoints. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1499–1508 (2001).
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D. & Pavletich, N. P. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 696–700 (1996).
- Russell, P. & Nurse, P. cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* **45**, 145–153 (1986).
- Russell, P. & Nurse, P. Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* **49**, 559–567 (1987).
- Russell, P., Moreno, S. & Reed, S. I. Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts. *Cell* **57**, 295–303 (1989).
- Rustici, G. *et al.* Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat. Genet.* **36**, 809–817 (2004).
- Sabatinos, S. A., Mastro, T. L., Green, M. D. & Forsburg, S. L. A mammalian-like DNA damage response of fission yeast to nucleoside analogs. *Genetics* **193**, 143–157 (2013).
- Saha, T., Ghosh, S., Vassilev, A. & DePamphilis, M. L. Ubiquitylation, phosphorylation and Orc2 modulate the subcellular location of Orc1 and prevent it from inducing apoptosis. *J. Cell Sci.* **119**, 1371–1382 (2006).
- Saka, Y., Esashi, F., Matsusaka, T., Mochida, S. & Yanagida, M. Damage and replication checkpoint control in fission yeast is ensured by interactions of Crb2, a protein with BRCT motif, with Cut5 and Chk1. *Genes Dev.* **11**, 3387–3400 (1997).
- Saka, Y. & Yanagida, M. Fission yeast cut5+, required for S phase onset and M phase restraint, is identical to the radiation-damage repair gene rad4+. *Cell* **74**, 383–393 (1993).
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning Vol. 2. Cold Spring Harbor N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
- Sánchez-Díaz, A., González, I., Arellano, M. & Moreno, S. The Cdk inhibitors p25rum1 and p40SIC1 are functional homologues that play similar roles in the regulation of the cell cycle in fission and budding yeast. *J. Cell Sci.* **111**, 843–851 (1998).
- Sato, M., Dhut, S. & Toda, T. New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **22**, 583–591 (2005).

- Saugar, I. *et al.* Temporal regulation of the Mus81-Mms4 endonuclease ensures cell survival under conditions of DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **41**, 8943–8958 (2013).
- Sazer, S. & Sherwood, S. W. Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast. *J. Cell Sci.* **97**, 509–516 (1990).
- Schonbrun, M. *et al.* TOR Complex 2 Controls Gene Silencing, Telomere Length Maintenance, and Survival under DNA-Damaging Conditions. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4584–4594 (2009).
- Schonbrun, M., Kolesnikov, M., Kupiec, M. & Weisman, R. TORC2 Is Required to Maintain Genome Stability during S Phase in Fission Yeast. *J. Biol. Chem.* **288**, 19649–19660 (2013).
- Segurado, M., de Luis, A. & Antequera, F. Genome-wide distribution of DNA replication origins at A+T-rich islands in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO Rep.* **4**, 1048–1053 (2003).
- Senga, T. *et al.* PCNA is a cofactor for Cdt1 degradation by CUL4/DDB1-mediated N-terminal ubiquitination. *J. Biol. Chem.* **281**, 6246–6252 (2006).
- Shou, W. *et al.* Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* **97**, 233–244 (1999).
- Simanis, V. & Nurse, P. Characterization of the fission yeast *cdc10+* protein that is required for commitment to the cell cycle. *J. Cell Sci.* **92**, 51–56 (1989).
- Sipiczki, M. Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol.* **1**, 1011.1–1011.4 (2000).
- Simanis, V. & Nurse, P. The cell cycle control gene *cdc2+* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell* **45**, 261–268 (1986).
- Sivakumar, S., Porter-Goff, M., Patel, P. K., Benoit, K. & Rhind, N. In vivo labeling of fission yeast DNA with thymidine and thymidine analogs. *Methods* **33**, 213–219 (2004).
- Stern, B. & Nurse, P. A quantitative model for the *cdc2* control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet.* **12**, 345–350 (1996).
- Stern, B. & Nurse, P. Cyclin B proteolysis and the cyclin-dependent kinase inhibitor *rum1p* are required for pheromone-induced G1 arrest in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1309–1321 (1998).
- Stracka, D., Jozefczuk, S., Rudroff, F., Sauer, U. & Hall, M. N. Nitrogen source activates TOR (Target of Rapamycin) complex 1 via glutamine and independently of Gtr/Rag proteins. *J. Biol. Chem.* **289**, 25010–25020 (2014).
- Sturm, S. & Okayama, H. Domains determining the functional distinction of the fission yeast cell cycle “start” molecules Res1 and Res2. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1967–1976 (1996).
- Sugiyama, A., Tanaka, K., Okazaki, K., Nojima, H. & Okayama, H. A zinc finger protein controls the onset of premeiotic DNA synthesis of fission yeast in a Mei2-independent cascade. *EMBO J.* **13**, 1881–1887 (1994).
- Sveiczzer, A., Novak, B. & Mitchison, J. M. The size control of fission yeast revisited. *J. Cell Sci.* **109**, 2947–2957 (1996).

- Tahara, S., Tanaka, K., Yuasa, Y. & Okayama, H. Functional domains of rep2, a transcriptional activator subunit for Res2-Cdc10, controlling the cell cycle 'start'. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1577–1588 (1998).
- Tanaka, K. *et al.* A new cdc gene required for S phase entry of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a protein similar to the cdc10+ and SWI4 gene products. *EMBO J.* **11**, 4923–4932 (1992).
- Travesa, A. *et al.* DNA replication stress differentially regulates G1/S genes via Rad53-dependent inactivation of Nrm1. *EMBO J.* **31**, 1811–1822 (2012).
- Trovesi, C., Manfrini, N., Falcettoni, M. & Longhese, M. P. Regulation of the DNA Damage Response by Cyclin-Dependent Kinases. *J. Mol. Biol.* **425**, 4756–4766 (2013).
- Tournier, S. & Millar, J. B. A role for the START gene-specific transcription factor complex in the inactivation of cyclin B and Cut2 destruction. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3411–3424 (2000).
- Uhlmann, F., Bouchoux, C. & Lopez-Aviles, S. A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: revisited. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **366**, 3572–3583 (2011).
- Visintin, R. *et al.* The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol. Cell* **2**, 709–718 (1998).
- Watson J.D. *et al.* *Biología Molecular del Gen*. Editorial Médica Panamericana. Pp 154-162 (2008).
- Weisman, R., Roitburg, I., Nahari, T. & Kupiec, M. Regulation of leucine uptake by tor1+ in *Schizosaccharomyces pombe* is sensitive to rapamycin. *Genetics* **169**, 539–550 (2005).
- Whitehall, S., Stacey, P., Dawson, K. & Jones, N. Cell cycle-regulated transcription in fission yeast: Cdc10-Res protein interactions during the cell cycle and domains required for regulated transcription. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3705–3715 (1999).
- Wolf, D. A., McKeon, F. & Jackson, P. K. Budding yeast Cdc6p induces re-replication in fission yeast by inhibition of SCF(Pop)-mediated proteolysis. *Mol. Gen. Genet.* **262**, 473–480 (1999).
- Wood, V. *et al.* PomBase: a comprehensive online resource for fission yeast. *Nucleic Acids Res.* **40**, 695–699 (2012).
- Wu, P.-Y. J. & Nurse, P. Establishing the Program of Origin Firing during S Phase in Fission Yeast. *Cell* **136**, 852–864 (2009).
- Wuarin, J., Buck, V., Nurse, P. & Millar, J. B. A. Stable association of mitotic cyclin B/Cdc2 to replication origins prevents endoreduplication. *Cell* **111**, 419–431 (2002).
- Wyatt, H. D. M., Sarbajna, S., Matos, J. & West, S. C. Coordinated Actions of SLX1-SLX4 and MUS81-EME1 for Holliday Junction Resolution in Human Cells. *Mol. Cell* **52**, 234–247 (2013).
- Xue-Franzén, Y., Kjaerulff, S., Holmberg, C., Wright, A. & Nielsen, O. Genomewide identification of pheromone-targeted transcription in fission yeast. *BMC Genomics* **7**, 303 (2006).
- Yanagida, M. Cell cycle mechanisms of sister chromatid separation; roles of Cut1/separin and Cut2/securin. *Genes Cells* **5**, 1–8 (2000).

- Yanow, S. K., Lygerou, Z. & Nurse, P. Expression of Cdc18/Cdc6 and Cdt1 during G2 phase induces initiation of DNA replication. *EMBO J.* **20**, 4648–4656 (2001).
- Yamaguchi, S., Murakami, H. & Okayama, H. A WD repeat protein controls the cell cycle and differentiation by negatively regulating Cdc2/B-type cyclin complexes. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2475–2486 (1997).
- Yamaguchi, S., Okayama, H. & Nurse, P. Fission yeast Fizzy-related protein srw1p is a G1-specific promoter of mitotic cyclin B degradation. *EMBO J.* **19**, 3968–3977 (2000).
- Yamano, H. *et al.* The Spike of S phase Cyclin Cig2 Expression at the G1-S Border in Fission Yeast Requires Both APC and SCF Ubiquitin Ligases. *Mol. Cell* **6**, 1377–1387 (2000).
- Yamano, H. *et al.* Requirement of the SCFPop1/Pop2 Ubiquitin Ligase for Degradation of the Fission Yeast S Phase Cyclin Cig2. *J. Biol. Chem.* **279**, 18974–18980 (2004).
- Yamamoto, M. Regulation of meiosis in fission yeast. *Cell Struct. Funct.* **21**, 431–436 (1996).
- Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K. & Seufert, W. Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* **282**, 1721–1724 (1998).
- Zhu, W., Chen, Y. & Dutta, A. Rereplication by Depletion of Geminin Is Seen Regardless of p53 Status and Activates a G2/M Checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7140–7150 (2004).
- Zhu, Y., Takeda, T., Nasmyth, K. & Jones, N. pct1+, which encodes a new DNA-binding partner of p85cdc10, is required for meiosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.* **8**, 885–898 (1994).
- Zhu, Y., Takeda, T., Whitehall, S., Peat, N. & Jones, N. Functional characterization of the fission yeast Start-specific transcription factor Res2. *EMBO J.* **16**, 1023–1034 (1997).
- Zou, L. & Elledge, S. J. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**, 1542–1548 (2003).

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar a Sergio la oportunidad de venir a Salamanca a hacer la tesis en el 2.6. Gracias por las buenas ideas que me has dado y todo lo que me has enseñado estos años.

No he podido tener más suerte con vosotros, los compañeros del laboratorio. Nathalia, me ayudaste muchísimo a estar cómoda en el labo cuando llegué y a manejarme con este bicho. Estaré siempre muy agradecida por toda la paciencia que tuviste. Javi, gracias por ayudarme en cultivos celulares y por tus palabras de ánimo con la tesis. Silvia, gracias por estar ahí siempre dispuesta a reírte de mis tonterías. Marta, mil gracias por toda tu ayuda en todos los sentidos. Probablemente no te hagas una idea de cuánto has supuesto en esta tesis. He aprendido mucho de tí y este último tiempo te he echado mucho de menos. Espero poder verte pronto. Anae, muchas gracias por todo, por saber escuchar, dar buenos consejos y por tu trabajo organizando el labo. Y por preguntar quién quiere “otro más” a medias en el café. Livia, muchas gracias por tu tiempo y por todo lo que me has enseñado. Gracias por las millones de preguntas que te habré hecho en total y que siempre me has contestado con infinita paciencia. Gracias a Natalia sin hace y a Alicia por llegar al laboratorio y aportar tan buen rollo, además de temas de conversación y repostería variada que me han dado tantos ánimos en los cafés en la recta final de la tesis. Espero que tengáis mucha suerte con las tesis. Rubén, tu energía y motivación siempre me sirven de ayuda y gracias por interesarte y dar ánimos. Irene GV, muchas gracias por ser así de apañá y preguntar siempre qué tal va todo. Ojalá hubiéramos hecho más pilates juntas! Irene GH, muchísimas gracias por toda tu ayuda, por preguntar, aconsejar, por ayudarme tanto con el proyecto de Mastl, incluso en la estancia y, en general, por mostrar interés en mi trabajo.

Fuera del labo, pero muy cerquita tengo que darte las gracias Paula por estar ahí siempre, hacer de estilista, entrenadora personal y lo que haga falta. Nunca habrá una fideuá como la tuya.

Muchas gracias también a toda la gente del IBFG a la que he pedido ayuda estos años por atenderme siempre tan bien. A los que andáis por la biblioteca por resolverme tantas dudas. A los predocs y postdocs de las cenas, quedadas, aquel finde en Aveiro, las piraguas en Segovia y lo de tirarnos por un barranco. Gracias Sara por tu penosa imitación de hacer ballet a través del pasillo que atraviesa tres laboratorios, entre otras cosas. Muchas gracias Jesús por ser tan generoso, darme siempre tan buenos consejos y apuntarte a un bombardeo!

Raúl, muchísimas gracias por dejarme hacer la estancia en tu laboratorio en Burdeos. Me encantó ver lo que hacíais por allí y poder participar en vuestras reuniones. Me hiciste sentir una más desde el primer momento y te agradezco todo el tiempo que me dedicaste, los consejos y toda la ayuda con el proyecto, la mudanza y los papeles en francés. A Victor por enseñarme los protocolos del laboratorio y estar pendiente de que no metiera la pata más allá de cambiar PBS por agua... I also have to thank Ly and Clément for all your help, teach me French words, make me laugh all the time and share “madeleines” and chocolate. Clément, I will never forget your favourite flowers for your funeral... and Ly, I hope you will have soon your Thesis submitted without too much suffering!

A los del CIC, Sara, Bea y Conrad, por todas las cañas, los ánimos e interesaros siempre por mí.

A los grupos de Rafa y Victor del CABD por echarme una mano siempre que lo he necesitado. Ana Belén...aún recuerdo la práctica de pombe en el máster donde te lo pregunté todito!

A MJ, Cristina y “mi amigo Lui”, por el tiempo que hemos pasado juntos en Salamanca y las visitas a Pamplona y Madrid. Y por supuesto por “sabé subí y bajá” y demás tonterías.

Gracias a mis extremeños favoritos Nacho y Pichi por todas las rutas y paseos con baños, cerezos, buitres o cochinitillo al horno. Por ese colchón hace 5 años casi sin conocerme. Sé que también continuaremos nuestras aventurillas en unos años por Sevilla o vete tú a saber dónde... pos tú verá!!

A mi segunda familia, los biotecs y compañía, por todos los planes que hacemos juntos, por estar siempre pendiente todos de todos, por ayudarnos con las tesis los que hacemos tesis y por sacarnos del monotema los que no, por todas las visitas a Salamanca y los

kilómetros recorridos para vernos, por los días de playa, las casas rurales y el viaje a Mallorca, y por hacerme tanto reír. Qué arte tenéis!!

A Marta, Jesús y Manuel, por abrirme el camino y darme seguridad para ser más valiente. Y por los “tironeos de oreja” y advertencias también. Sin vosotros nunca me hubiera atrevido a irme de Sevilla. A mis padres, por el ejemplo que me habéis dado de esfuerzo y trabajo. Por ofrecerme muchas posibilidades para que yo pudiera escoger y por entender que esto es lo que me gusta, aunque os vaya a dar más de un dolor de cabeza y estemos lejos.

A Curro, por hacer que todo parezca fácil y ser tan valiente. Y gracias a Queen!!

