

Universidad de Salamanca-CSIC  
Departamento de Microbiología y Genética

Instituto de Biología Funcional y Genómica



VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



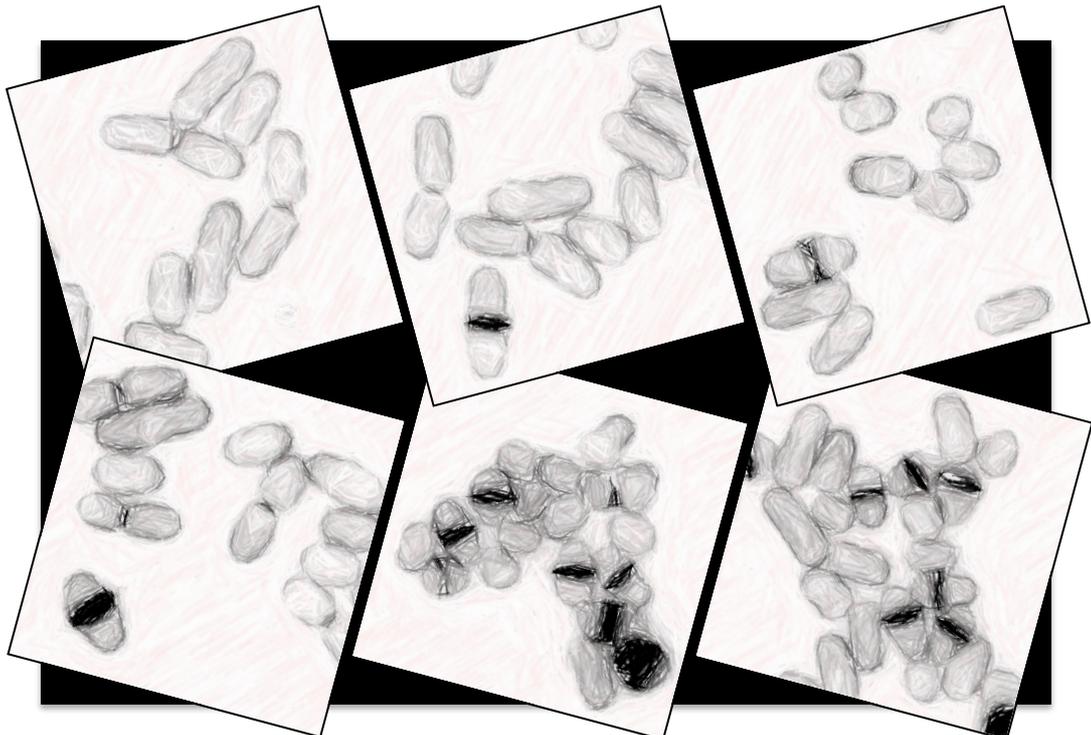
CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

# Identificación de nuevos reguladores del ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe*

Nathalia Chica Balaguera

2014



**Universidad de Salamanca-CSIC  
Departamento de Microbiología y Genética**

---

**Instituto de Biología Funcional y Genómica**



**Identificación de nuevos reguladores  
del ciclo celular en  
*Schizosaccharomyces pombe***

**Nathalia Chica Balaguera**

**2014**



**Universidad de Salamanca-CSIC**  
**Departamento de Microbiología y Genética**  
**Instituto de Biología Funcional y Genómica**



**Dr. D. Luis Fernández Lago, Profesor Titular y Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca**

**CERTIFICA:**

Que la memoria titulada “Identificación de nuevos reguladores del ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe*” presentada por la licenciada D<sup>a</sup>. Nathalia Chica Balaguera para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Sergio Moreno Pérez en el Centro Mixto de Biología Funcional y Genómica, CSIC-Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética).

Y para que así conste, expide el certificado en Salamanca,  
a 25 de Febrero de 2014

Fdo. Luis Fernández Lago



**Universidad de Salamanca-CSIC**  
**Departamento de Microbiología y Genética**  
**Instituto de Biología Funcional y Genómica**



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

**CERTIFICA:**

Que la memoria titulada “Identificación de nuevos reguladores del ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe*” presentada por la licenciada D<sup>a</sup>. Nathalia Chica Balaguera para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Centro Mixto de Biología Funcional y Genómica, CSIC-Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética).

Y para que así conste, expide el certificado en Salamanca,  
a 25 de Febrero de 2014

Fdo. Sergio Moreno Pérez  
Director de la Tesis



**Universidad de Salamanca-CSIC**  
**Departamento de Microbiología y Genética**

**Instituto de Biología Funcional y Genómica**



**Dr. D. Javier Botet Rodríguez, Investigador del Instituto de biología Funcional y Genómica**

**CERTIFICA:**

Que la memoria titulada “Identificación de nuevos reguladores del ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe*” presentada por la licenciada D<sup>a</sup>. Nathalia Chica Balaguera para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Centro Mixto de Biología Funcional y Genómica, CSIC-Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética).

Y para que así conste, expide el certificado en Salamanca,  
a 25 de Febrero de 2014

Fdo. Javier Botet Rodríguez  
Codirector de la Tesis



**Universidad de Salamanca-CSIC**  
**Departamento de Microbiología y Genética**  
**Instituto de Biología Funcional y Genómica**



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

**CERTIFICA:**

Que la memoria titulada “Identificación de nuevos reguladores del ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe*” presentada por la licenciada D<sup>a</sup>. Nathalia Chica Balaguera para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Sergio Moreno Pérez en el Centro Mixto de Biología Funcional y Genómica, CSIC-Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética).

Y para que así conste, expide el certificado en Salamanca,  
a 25 de Febrero de 2014

Fdo. Francisco del Rey Iglesias  
Tutor de la Tesis

Esta tesis doctoral ha sido financiada por una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España con referencia BES-2009-025690 y asociada al proyecto de investigación BFU2008-01808 en el Organismo

A Mis papás  
A mis chicos  
A Marina



# Índice

**INTRODUCCION**

<b>1. División celular en eucariotas</b>	<b>1</b>
1.1 El ciclo celular	1
1.2 Sistemas que controlan el ciclo celular	2
1.3 El ciclo de vida de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3
1.4 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> como un modelo en biología celular	5
1.5 Mutantes de ciclo: <i>cdc</i> y <i>wee</i>	6
<b>2. El control del ciclo celular en <i>S. pombe</i>: mecanismos moleculares</b>	<b>7</b>
2.1 El complejo Cdk-ciclina	7
2.1.1 Las ciclinas	8
2.1.2 La fosforilación de Cdc2	9
2.2 Reguladores de la Cdk	11
2.2.1 La quinasa Wee1	11
2.2.2. La quinasa Mik1	12
2.2.3 La fosfatasa Cdc25	13
2.3 Los puntos de control ( <i>checkpoints</i> ) del ciclo mitótico	15
2.3.1 Transición G1/S	15
2.3.2 Transición G2/M	15
2.3.3 Transición Metafase-Anafase	15
2.4 Un único oscilador mitótico	16
<b>3. Señales que controlan el ciclo celular</b>	<b>17</b>
3.1 Señales nutricionales	17

## Índice

3.2 Respuesta a estrés	22
<b>4. Antagonistas de la actividad Cdk-ciclina</b>	<b>22</b>
4.1 Fosfatasa tipo 2A (PP2A)	23
4.2 Fosfatasa tipo 1 (PP1)	25
<b>OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>RESULTADOS APARTADO I</b>	
<b>1. Identificación de una red de interacciones genéticas asociadas al ciclo celular en <i>S. pombe</i></b>	<b>33</b>
1.1 Escrutinio masivo de sintéticos letales (SGA)	34
1.2 Estimación del crecimiento relativo (RG) e identificación del espectro de las interacciones genéticas	35
1.3 Validación de resultados y normalización de los valores de crecimiento relativo	38
1.3.1 Efecto de la ejecución del escrutinio por fases	37
1.3.2 Efecto de genes diana ligados al gen de interés	39
1.3.3 Efecto de borde, espacial y del mutante vecino en la placa	39
1.4 Red de interacciones genéticas con los mutantes <i>wee1-50</i> y <i>cdc2-3w</i>	41
<b>2. Análisis funcional de la red de sintéticos letales con <i>wee1-50</i> y <i>cdc2-3w</i></b>	<b>47</b>
<b>3. Caracterización comprensiva de los mutantes no esenciales identificados como elementos que interaccionan con <i>wee1-50</i> y <i>cdc2-3w</i></b>	<b>58</b>

<b>4. Predicción de una red genética complementaria</b>	<b>60</b>
<b>RESULTADOS APARTADO II</b>	
<b>1. Identificación del gen <i>ppa2</i><sup>+</sup> como un regulador de ciclo en <i>S. pombe</i></b>	<b>65</b>
1.1. La delección de <i>ppa2</i> <sup>+</sup> genera células mas pequeñas que la cepa silvestre	65
1.2 El mutante de delección de la fosfatasa tipo 2A <i>ppa2</i> $\Delta$ es sintético letal con <i>wee1-50</i>	66
1.3. La delección de <i>ppa2</i> $\Delta$ rescata parcialmente el fenotipo del mutante termosensible <i>cdc25-22</i>	67
<b>2. Identificación de dos nuevos reguladores de la entrada a mitosis en <i>S. pombe</i></b>	<b>68</b>
2.1 Identificación del homólogo funcional de Ensa y Arrp19 en <i>S. pombe</i>	68
2.2 Las células del mutante <i>igo1</i> $\Delta$ se dividen a un tamaño celular mayor que las de la cepa silvestre	70
2.3 La ausencia de <i>igo1</i> <sup>+</sup> agrava el fenotipo del mutante termosensible <i>cdc25-22</i>	71
<b>3. La función biológica de Igo1 esta sujeta a una modulación nutricional</b>	<b>74</b>
3.1 El fenotipo de retraso en la entrada a mitosis del mutante <i>igo1</i> $\Delta$ se acentúa bajo estrés por nitrógeno	74

## Índice

3.2 Igo1 induce la entrada a mitosis en <i>S. pombe</i> en respuesta a una limitación de nitrógeno	79
3.3 El retraso de entrada a mitosis en células que carecen de Igo1 no es dependiente de la actividad de Rad3 pero si de Cdc25	81
<b>4. Caracterización de la ruta Greatwall-ENSA en <i>S.pombe</i></b>	<b>84</b>
4.1 Identificación del ortólogo funcional de <i>Greatwall</i> en <i>S. pombe</i>	84
4.2 La doble delección de las quinasas Ppk18 y Cek1 reproducen el fenotipo de la ausencia de Igo1	86
4.3 Ppk18 actúa por encima de Igo1	88
4.4 El papel de Igo1 implica la inhibición de PP2A-pab1	89
<b>5. La actividad de Igo1 como respuesta a un cambio nutricional</b>	<b>91</b>
5.1 La actividad de Igo1 depende del sitio de fosforilación S64 (Ser)	93
5.2 El estado de fosforilación de Igo1 depende de un cambio nutricional	93
5.3 La fosforilación de Igo1 en la S64 depende de Ppk18	95
5.4 La sobreexpresión de Ppk18 induce entrada a mitosis y un cese en el crecimiento a través de Igo1	95
<b>6. La ruta Ppk18-Igo1-PP2A es un sensor nutricional</b>	<b>100</b>
6.1 TORC1 (Tor2) regula negativamente la activación de Igo1	100

6.2 La proteína quinasa A (PKA) regula negativamente la activación de Igo1	104
7. La actividad de Igo1 es independiente de otros mecanismos de regulación de entrada a mitosis en <i>S. pombe</i>	107
<b>DISCUSIÓN</b>	
<b>APARTADO I</b>	
1. Mapa funcional de la regulación de la Cdk en <i>S. pombe</i>	113
2. Análisis de la composición de la redes de interacción genética identificadas	117
3. Nuevos reguladores del ciclo celular en <i>S. pombe</i> : Predicción de función y relaciones	118
<b>APARTADO II</b>	
1. Ppk18 ( <i>Greatwall</i> ) e Igo1 (Ensa) actúan como reguladores positivos de la entrada a mitosis en <i>S. pombe</i>	122
2. La ruta <i>Greatwall</i> -Ensa-PP2A coordina la entrada a mitosis como respuesta a estrés nutricional en <i>S. pombe</i>	124
3. TORC1 (Tor2) y la proteína quinasa A (PKA) regulan negativamente la actividad de la ruta <i>Greatwall</i> -Ensa en <i>S. pombe</i>	127
<b>CONCLUSIONES</b>	135
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO</b>	
Tabla S1	139
Tabla S2	143
Tabla S3	147

## Índice

Tabla S4	149
Tabla S5	154
Tabla S6	159
Tabla S7	160
Tabla S8	164
Tabla S9	165
Tabla S10	166
Tabla S11	167
Tabla S12	169
Figura S1	171

## MATERIALES Y MÉTODOS

<b>1. Microorganismos utilizados</b>	<b>175</b>
1.1 Cepas de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	175
1.2 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	176
<b>2. Medios y condiciones de cultivo</b>	<b>176</b>
2.1 Cultivos de <i>S. pombe</i>	176
2.2 Cultivos de <i>E. Coli</i>	177
<b>3. Escrutinio Sistemático de Sintéticos Letales (SGA)</b>	<b>177</b>
3.1 Selección de mutaciones para el análisis genético	178
3.1.1 Marcaje de los mutantes <i>wee</i> (cepas de interés) y cepa silvestre (cepa control)	178
3.1.2 Colección de los mutantes no esenciales de delección Bioneer (cepas diana)	178

<b>3.2 Obtención de los dobles mutantes para el análisis genético</b>	<b>179</b>
<b>3.2.1. Genotipos de las cepas parentales</b>	<b>179</b>
<b>3.2.2 Nomenclatura de las placas</b>	<b>179</b>
<b>3.2.3 Medios y condiciones de crecimiento</b>	<b>180</b>
<b>3.2.4 Concentración de drogas</b>	<b>180</b>
<b>3.2.5 Preparación de las cepas diana (<i>target</i>) y de interés (<i>query</i>)</b>	<b>181</b>
<b>3.2.6 Cruce entre cepas diana (<i>target</i>) y de interés (<i>query</i>)</b>	<b>181</b>
<b>3.2.7 Esporulación</b>	<b>181</b>
<b>3.2.8 Enriquecimiento de esporas y eliminación de parentales haploides y diploides</b>	<b>181</b>
<b>3.2.9 Germinación</b>	<b>182</b>
<b>3.2.10 Selección de los dobles mutantes</b>	<b>182</b>
<b>3.2.11 Visión en conjunto del protocolo del SGA</b>	<b>182</b>
<b>3.2.12 Digitalización de los resultados</b>	<b>182</b>
<b>3.2.13 Estimación del crecimiento de los dobles mutantes sobre agar</b>	<b>183</b>
<b>3.3 Procesamiento de datos</b>	<b>184</b>
<b>3.3.1 Algoritmo de crecimiento relativo y rango de puntuación</b>	<b>184</b>

## Índice

3.3.2 Pre-procesamiento y normalización	185
3.3.3 Control de calidad y grado de confianza	186
<b>4. Análisis fenotípico de los mutantes que interactúan con <i>wee1-50</i> y <i>cdc2-3w</i></b>	<b>187</b>
4.1 Estado morfológico y citológico	187
4.2 Estado de la dinámica del ciclo celular	187
<b>5. Ensayos bajo estrés nutricional</b>	<b>187</b>
5.1. Estrés por nitrógeno. Análisis del ciclo celular	188
5.2 Estrés por nitrógeno. Medición del tamaño celular y ensayos bioquímicos	188
5.3 Estrés por glucosa.	189
<b>6. Ensayos de viabilidad en placa</b>	<b>189</b>
6.1 Ensayos de gota en <i>S. pombe</i>	189
<b>7. Técnicas de transformación</b>	<b>190</b>
7.1 Transformación de <i>S. pombe</i>	190
7.2 Transformación de <i>E. Coli</i>	190
<b>8. Construcción de cepas de <i>S. pombe</i></b>	<b>191</b>
8.1 Deleción de genes	191
8.1.1 Deleciones en un fondo genético haploide	191
8.1.1.1 Deleción de <i>igo1</i> <sup>+</sup>	191
8.1.1.2 Deleción de <i>ppa2</i> <sup>+</sup>	191

8.1.1.3 Deleción de <i>pab1</i>	192
8.1.2 Deleción en un fondo genético diploide	192
8.1.2.1 Construcción del diploide h+/h-	192
8.1.2.2 Deleción de <i>ppk18</i> <sup>+</sup>	193
8.2 Integración de la construcción <i>KanMX6-p3nmt1-3HA</i> en el locus <i>ppk18</i> <sup>+</sup>	193
8.3 Cruces genéticos	193
8.3.1 Disección de tétradas	194
8.3.2 Análisis de esporas al azar	194
<b>9. Técnicas de manipulación del ADN</b>	<b>195</b>
9.1 Métodos de extracción	195
9.1.1 Extracción de ADN genómico de <i>S. pombe</i>	195
9.1.2 Extracción de ADN plasmídico de <i>E. Coli</i>	196
9.2 Digestión de ADN con enzimas de restricción	196
9.3 Electroforesis de fragmentos de ADN	197
9.4 Purificación de fragmentos de ADN	197
9.5 Plásmidos	197
9.6 Determinación de la concentración de ADN	197
9.7 Reacciones de amplificación de ADN (PCR)	198
9.7.1 Lista de oligonucleótidos utilizados	198
9.8 Secuenciación de ADN	198
9.9 Mutagénesis dirigida: construcción del mutante <i>igo1-S64A</i> e <i>igo1-S64E</i>	198

## Índice

9.9.1 Construcción de la cepa <i>igo1::ura4+</i>	198
9.9.2 Clonaje de <i>igo1<sup>+</sup></i> en <i>pBluescriptSK-ura4+</i>	203
9.9.3 Mutagénesis	203
9.9.4 Integración en el genoma de <i>S. pombe</i>	204
<b>10. Técnicas de manipulación de proteínas</b>	<b>204</b>
10.1 Obtención de los anticuerpos policlonales anti-igo1	204
10.1.1 Obtención del anticuerpo anti-igo1-C-terminal	204
10.1.2 Obtención del anticuerpo fosfo-específico anti-S64-Igo1	205
10.2 Inmunodetección por <i>Western Blot</i>	205
10.2.1 Preparación de extractos proteicos en condiciones desnaturalizantes	205
10.2.2. Valoración de la concentración de proteína en los extractos totales	206
10.2.3 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE	206
10.2.4 Análisis por <i>Western blot</i> en membranas de PVDF	207
10.3 Anticuerpos utilizados	208
<b>11. Microscopía y tinciones</b>	<b>208</b>
11.1 Microscopía de campo claro	208
11.2 Microscopía de contraste interferencial (DIC) y fluorescencia	208
11.2.1 Tinción de núcleos y septos con DAPI	209
11.2.2 Mediciones celulares <i>in vivo</i> mediante tinción con <i>blankophor</i>	209

11.2.3 Ensayos de <i>time-lapse</i> con fluorescencia	209
<b>12. Citometría de flujo</b>	<b>210</b>
12.1 Fijación y tinción de las células	210
12.2 Adquisición y análisis de resultados	210
<b>13. Tratamiento informático y estadístico de los datos</b>	<b>211</b>
13.1 Análisis informático del escrutinio	
13.2 Análisis de secuencias	211
13.3 Análisis estadístico	211
13.4 Presentación de datos	212
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>215</b>

# Introducción

## 1. División celular en eucariotas

### 1.1 El ciclo celular

La división o reproducción celular es un proceso fundamental para las células. Su coordinación con el crecimiento celular, determina el éxito evolutivo en todos los organismos. En el caso de los organismos eucariotas, la división celular engloba una secuencia de eventos, denominados en su conjunto **ciclo celular**, el cual conduce a la generación de dos células hijas. Estas células hijas, en organismos unicelulares generan nuevas identidades y en organismos multicelulares, asociaciones especializadas de células que originan tejidos y órganos.

Con el fin de evitar el fracaso, la célula eucariota distribuye el ciclo celular en cuatro eventos discretos que le permite manejarlo con precisión y fiabilidad. En orden de ocurrencia, éstos eventos son: **i) la fase G1** (del inglés *Gap1*), donde se acopla el crecimiento celular con la síntesis del ARN y de proteínas; **ii) la fase S** (del inglés *Synthesis*), donde replica el ADN y duplica los cromosomas; **iii) la fase G2** (del inglés *Gap2*), donde continúa con la síntesis de proteínas y crece hasta un tamaño ideal para llevar a cabo la mitosis; **iv) la fase M**, último evento que incluye la repartición del material genético en dos células hijas (**mitosis**) y la división del citoplasma (**citoquinesis**). Los primeros tres eventos son conocidos en conjunto como **interfase**.

Durante la fase S, múltiples proteínas separan las dos hebras del ADN, para exponer sus sitios de origen de la replicación a la maquinaria encargada de duplicar el material genético en la célula. En dichos sitios, esta maquinaria se desplaza a lo largo de ambas hebras en sentidos contrarios y origina las copias correspondientes a cada una. A continuación, se incrementa la producción de proteínas llamadas histonas, que se encargan de empaquetar el ADN en estructuras denominadas cromosomas. Asimismo, dichas proteínas estabilizan los cromosomas, manteniendo unidas ambas copias. El principal objetivo de la mitosis, es distribuir el material replicado en dos células hijas. De esta forma, antes de dar inicio a esta, la célula sufre cambios estructurales en el ADN, que implican condensar la cromatina recién replicada y hasta entonces dispersa en el núcleo, en cromatina condensada (**profase mitótica**). Este evento es necesario para

## Introducción

permitir a la célula avanzar desde interfase hacia mitosis. Cada cromosoma se compone de dos cromátides hermanas, que se encuentran unidos a una red de microtúbulos. Esta red de microtúbulos, antes organizada a lo largo del citoplasma, se reorganiza en el huso mitótico, que consiste en una estructura bipolar que emana de dos estructuras llamadas centrosomas (previamente duplicado en interfase). Dicho huso se encarga de separar las cromátides hermanas en direcciones opuestas hacia los polos de la célula, durante la transición **metafase-anafase**, para llevar a cabo el proceso conocido como segregación cromosómica y originar los nuevos núcleos de las células hijas. Seguido a la mitosis, la célula se divide físicamente a través de la citoquinesis y a continuación, se reconstruye la estructura física de las nuevas células. Paralelamente a estos procesos, los componentes citoplasmáticos como macromoléculas, ARNs y orgánulos son duplicados a lo largo del ciclo celular, para luego ser repartidos equitativamente en cada célula hija durante la citoquinesis. En la mayoría de los organismos, los eventos discretos del ciclo celular están acoplados con el crecimiento celular. De esta manera, la masa celular se duplica pero el tamaño permanece aproximadamente constante. En muchos tipos de células, el crecimiento y la división no está coordinada, por ejemplo en oocitos de mamíferos, neuronas y células del músculo (revisado en Nasmyth, 1999 y Morgan, 2007).

### 1.2 Sistemas que controlan el ciclo celular

Para vigilar que cada fase ocurra con fidelidad y bajo un orden y un tiempo adecuado, la célula cuenta con sistemas de comprobación que frenan o avanzan las diferentes fases del ciclo celular. Esto es realizado en sitios específicos llamados puntos de control (en inglés *checkpoints*), situados en la fase G1 tardía, la transición G2/M y en mitosis, en la transición metafase-anafase (Hartwell y Weinert, 1989).

La eficiencia de estos sistemas de control, reside en una serie de mecanismos que contribuyen a la regulación de la actividad de complejos llamados **Cdks** (del inglés *cyclin-dependent kinases*). La transición de una fase a otra, obedece a las oscilaciones en la actividad de estos complejos, que a su vez dependen de estados de fosforilación de la subunidad catalítica (**quinasa**) y de cambios en la cantidad de la subunidad reguladora (**ciclina**). En eucariotas superiores, múltiples complejos Cdk-ciclina se encargan de mantener la ejecución y la periodicidad de las fases, mientras que en eucariotas inferiores dichos complejos son menos diversificados (Tabla 1). En conjunto, estos componentes junto con los mecanismos de regulación, constituyen el sistema de control

del ciclo celular (Morgan, 1997; Ubersax *et al.*, 2003).

**Tabla 1. Complejos Cdk-ciclina en eucariotas**

Especies	Quinasas	Ciclinas (asociada a cada Cdk)
<i>S. pombe</i>	Cdc2	Puc1, Cig1, Cig2, Cdc13
<i>S. cerevisiae</i>	Cdc28	Cnl1,2,3 y Clb1,2,3,4,5,6,
<i>D. melanogaster</i>	Cdk1	A,B, B3, E
	Cdk2	E,A
	Cdk4	D
<i>X. laevis</i>	Cdk1	A,B
	Cdk2	A,E
<i>H. Sapiens</i>	Cdk1	A,B
	Cdk2	E
	Cdk4	D1,D2,D3
	Cdk6	D1,D2,D3

Revisado en Morgan, 2007

### 1.3 El ciclo de vida de *Schizosaccharomyces pombe*

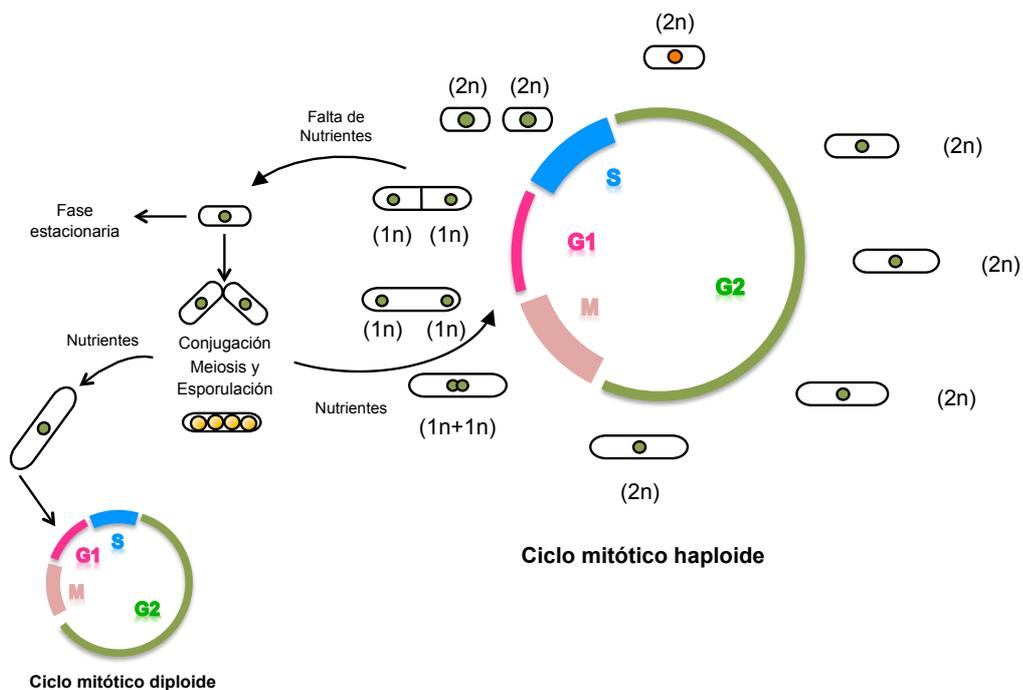
La levadura de fisión es un organismo eucariota unicelular con forma cilíndrica, que mide 14 µm de longitud y entre 3 y 4 µm de diámetro cuando crece en medio rico. Como lo dice su nombre, se divide por fisión binaria dando lugar a dos células hijas de igual tamaño. Al igual que el resto de eucariotas, presenta un ciclo celular en el que alterna el crecimiento con la división celular. Normalmente, las células son haploides, pero diploidizan cuando las condiciones nutricionales empobrecen (Egel, 2004). El tamaño de su genoma es de 13,8 Mb y está distribuido entre tres cromosomas (I con 5,7 Mb; II con 4,6 Mb y III con 3,5 Mb) y el ADN mitocondrial (20kb) (Lang *et al.*, 1987; Wood *et al.*, 2002).

En comparación con otros organismos, su ciclo celular se caracteriza por tener una fase G1 muy corta y una fase G2 mas larga (Mitchison y Creanor, 1971). En crecimiento exponencial, la fase S comienza antes de que la citoquinesis haya terminado (Figura 1). De lo anterior se deduce, que a pesar de ser un organismo haploide, esta levadura permanece la mayor parte del tiempo del ciclo celular con dos copias del material genético (pseudodiploide), sobrellevando así los riesgos de tener una sola copia.

## Introducción

Asimismo, el principal *checkpoint* del ciclo celular reside en la transición G2/M, en la cual el tamaño celular dependiente de nutrientes es monitorizado (Fantes, 1977; Fantes y Nurse, 1977). De esta forma, una célula de *S. pombe* puede variar su tamaño celular en función de la disponibilidad de nutrientes. Si los nutrientes en el medio son abundantes, la célula crece durante la fase G2 hasta alcanzar el tamaño celular adecuado antes de la división celular. Por el contrario, cuando los nutrientes son limitados las células disminuyen el tiempo de duración de la fase G2, aceleran la entrada a mitosis y en consecuencia reducen su tamaño. Para mantener la homeostasis del tamaño celular, la levadura de fisión extiende la fase G1 y a su vez activa el segundo *checkpoint* de tamaño de la transición G1/S (Fantes, 1977, Nurse y Thuriaux, 1977).

En *S. pombe*, como respuesta a la privación de nutrientes, se dan dos alternativas. Si en el cultivo solo hay células del mismo tipo sexual (h+ o h-), se bloquean en G1 o en



**Figura 1. Esquema del ciclo celular y del ciclo de vida de *S. pombe*.** El ciclo celular de *S. pombe* se caracteriza por tener una fase G1 corta y una fase G2 más larga. En crecimiento exponencial, la fase S empieza antes de que haya terminado la citoquinesis. Cuando los nutrientes se agotan las células de tipo sexual opuesto conjugan y forman un cigoto diploide que entra a meiosis y esporula. Si el cigoto diploide detecta condiciones favorables en el medio, entra en ciclo mitótico. Cuando el medio empobrece de nuevo, entra a meiosis y esporula.

G2, dependiendo de la temperatura y del recurso limitante, nitrógeno o carbono (Costello *et al.*, 1986).

Por el contrario, si hay dos células de tipo sexual opuesto ( $h^+$  y  $h^-$ ), se bloquean en G1 y a continuación inician la conjugación para dar lugar a un cigoto, que entrará en ciclo meiótico y formará un asca con cuatro esporas haploides. Si estas esporas encuentran un ambiente propicio, germinarán y entrarán de nuevo en el ciclo mitótico. Si no, se mantendrán en dicho estado hasta entonces (Egel, 1989; Egel, 2004). El estado diploide es muy inestable y sólo puede mantenerse si el cigoto detecta un medio rico antes de llevar a cabo la meiosis (MacNeill y Nurse, 1997).

### 1.4 *Schizosaccharomyces pombe* como un modelo en biología celular

Evolutivamente, la levadura de fisión se separó de su relativo, *Saccharomyces cerevisiae*, hace más de 400 millones de años (Sipiczki, 2000), por lo que se ha sugerido que el comportamiento biológico de *S. pombe* es más similar al resto de eucariotas que a la levadura de la cerveza (Wood *et al.*, 2002). *S. pombe* tiene proporcionalmente más genes conservados en animales que los que tiene *S. cerevisiae*; sin embargo en algunos casos, cada una comparte genes con los metazoos que la otra levadura carece. Ambas levaduras comparten entre sí un 75% de genes identificados como ortólogos (Dixon *et al.*, 2008). A pesar de esto, presentan características que les hacen diferentes en su biología. Entre estas, destacan algunas como el hecho de que las células de *S. pombe* se dividen por fisión, mientras que las de *S. cerevisiae* lo hace por gemación. Sumado a esto, en *S. pombe* la conjugación y la meiosis están acopladas, y en consecuencia sólo el cigoto manifiesta el estado diploide, mientras que en *S. cerevisiae* se encuentran desacopladas y las células vegetativas pueden ser tanto haploides como diploides. Por otro lado, las células de *S. pombe* permanecen más tiempo en fase G2, mientras que las de *S. cerevisiae* en fase G1. De igual forma, algunos aspectos moleculares no conservados en *S. cerevisiae*, le sitúan más cercana a los metazoos, por ejemplo la presencia de múltiples intrones en los genes, la expresión génica controlada por una maquinaria similar a la del ARN interferente (RNAi), mecanismos epigenéticos que controlan los cambios en la estructura de la cromatina y la regulación del ciclo celular a través del control de la transición G2/M (revisado en Sunnerhagen, 2002 y Wood *et al.*, 2006).

## Introducción

De acuerdo a lo anterior, *S. pombe* demuestra ser un mejor modelo para estudiar algunos procesos celulares fundamentales conservados en eucariotas superiores, incluyendo dinámica de la cromatina y regulación del ciclo celular. De igual forma, la levadura de fisión tiene ventajas como modelo para el estudio de la biología celular y molecular, debido a que: **i)** es un sistema genético manejable y fácilmente manipulable en el laboratorio, **ii)** es posible seguir su ciclo celular en un tiempo corto, **iii)** es estable en estado haploide, permitiendo la evaluación del fenotipo que producen las mutaciones recesivas, **iv)** los genes esenciales pueden ser caracterizados mediante mutaciones condicionales dependientes de temperatura y **v)** en consecuencia de la era post-genómica, se ha convertido en un organismo ideal para estudiar las interacciones genéticas a gran escala (revisado en Forsburg y Nurse, 1991; Forsburg, 2005; Dixon *et al.*, 2009).

### 1.5 Mutantes de ciclo: *cdc* y *wee*

Los estudios genéticos relacionados al estudio del ciclo celular con *S. pombe*, han permitido aislar mutantes que se bloquean en un punto concreto del ciclo celular o tienen un ciclo celular alterado, sugiriendo que sus funciones son esenciales para la progresión celular. El ciclo celular mitótico en las células de *S. pombe* es fácil de seguir, ya que existe una correlación entre la longitud celular y la fase del ciclo en la que se encuentran las células.

Teniendo en cuenta esta particularidad, los primeros mutantes del ciclo celular que se identificaron fueron los mutantes *cdc* (*del inglés cell división cycle*) (Nurse *et al.*, 1976). Los genes implicados en estas mutaciones son esenciales, lo que significa que estos mutantes son condicionales. A temperatura restrictiva, estos mutantes se bloquean en un punto del ciclo celular pero pueden seguir creciendo, lo que significa que su fenotipo principal son células más alargadas que la cepa silvestre. La identificación de estos, permitió establecer la existencia de *checkpoints* que determinan la progresión de una fase a otra y que a su vez son dependientes funcionalmente de los genes alterados para ser completados. Paul Nurse, también identificó los mutantes *wee* (del vocablo escocés *wee* que significa pequeño), cuya característica principal es que presentan una fase G2 corta y por ende, que llevan a cabo la división celular a un tamaño celular reducido (Nurse, 1975; Nurse y Thuriaux, 1980). Existen dos clases de mutantes *wee*: **i)** aquellos que obvian el control de la proteína fosfatasa Cdc25, ya sea por producir en

exceso esta proteína (*OP-cdc25*) o por alterar a Cdc2 (*cdc2-3w* y *cdc2-4w*) de tal forma que ya no requiere de la actividad de Cdc25, y **ii**) aquellos que eliminan el control de *wee1<sup>+</sup>*, ya sea por inactivación de la proteína quinasa Wee1 (*wee1-50*), sobreproducción de la proteína quinasa Cdr1/Nim1 (*OP-cdr1*) o alteración de la proteína Cdc2 de tal manera que la hace insensible a la actividad de Wee1 (Enoch y Nurse, 1990; revisado en MacNeill y Nurse, 1989). Con la caracterización de estos mutantes, se estableció la función de los genes *wee1<sup>+</sup>* y *cdc2<sup>+</sup>* en *S. pombe* sobre el control del inicio de la mitosis. Finalmente, Russell y Nurse en 1986 y 1987a, completaron la colección identificando alelos mutantes para el gen *cdc25<sup>+</sup>* y *wee1<sup>+</sup>*, definiendo así a Cdc25 y Wee1 como los reguladores positivos y negativos respectivamente de Cdc2 en la entrada a mitosis.

## 2. El control del ciclo celular en *S. pombe*: mecanismos moleculares

El control del ciclo celular consiste en una serie de eventos bioquímicos que dirigen el orden de ocurrencia de las fases y el tiempo de duración de las mismas. Los componentes claves de este sistema son los complejos Cdk-ciclina y sus principales reguladores en G2, conocidos en *S. pombe* como Wee1, Mik1 y Cdc25. Estos complejos Cdk-ciclina son los encargados de llevar a cabo toda la progresión del ciclo celular a través de oscilaciones en su actividad quinasa, y a su vez de actuar como eje central en la conexión entre la maquinaria principal de regulación del ciclo celular y otros procesos celulares. Estos procesos son mantenidos por capas de regulación secundarias, que constituyen el sistema global de integración entre la información extracelular con las rutas de señalización intracelulares (revisado en Morgan, 2007).

En su mayoría se encuentran conservados evolutivamente en todos los organismos eucariotas, los cuales fueron por primera vez dilucidados en los trabajos realizados por los investigadores Lee Hartwell y Paul Nurse, usando como modelos a *S. cerevisiae* y *S. pombe* respectivamente.

### 2.1 El complejo Cdk-ciclina

En todos los organismos, la maquinaria principal del ciclo celular es un complejo enzimático constituido por dos tipos de proteínas: las Cdk (subunidad catalítica) y las ciclinas (subunidad reguladora). Su actividad es modulada por inhibidores específicos y cambios en la fosforilación de la subunidad catalítica que responde a estímulos como

## Introducción

disponibilidad de nutrientes, tamaño celular y mecanismos de activación de los *checkpoints* del ciclo. A diferencia de otros eucariotas, las células de *S. pombe* poseen una única Cdk codificada por el gen *cdc2*<sup>+</sup> (Simanis y Nurse, 1986). La regulación en los niveles de actividad permite la progresión irreversible desde la fase G1 a la fase S, y desde la fase G2 a mitosis. En particular, la replicación del ADN y la mitosis es controlada a través de la unión de Cdc2 a las ciclinas Cig2 y Cdc13, respectivamente. La unión a otras dos ciclinas Cig1 y Puc1 controla la progresión por fase G1 (Hagan *et al.*, 1988; Bueno *et al.*, 1991; Bueno y Russell, 1993; Martín-Castellanos *et al.*, 2000). Estudios de la actividad de la Cdk y su dependencia a las ciclinas, han demostrado que Cdc13 es la única ciclina relevante para dirigir la ejecución completa del ciclo celular en este organismo (Fisher y Nurse, 1996; Martín-Castellanos *et al.*, 2000; Coudreuse y Nurse, 2010).

### 2.1.1 Las ciclinas

Las ciclinas fueron identificadas como proteínas que oscilan en su abundancia a lo largo del ciclo celular a través de eventos que incluyen síntesis de proteínas y degradación (Evans *et al.*, 1983). Estas se acumulan durante periodos específicos del ciclo celular, que son regulados a través de un dominio denominado caja de ciclinas (del inglés *cyclin box*). En células de eucariotas superiores, se han identificado múltiples ciclinas, que regulan el ciclo celular dependiendo de dónde y cuándo son expresadas, permitiendo una mayor flexibilidad en el control del ciclo celular y en la modulación de la actividad de la Cdk (van der Voet *et al.*, 2009).

En particular, en *S. pombe* se han identificado 4 ciclinas, incluyendo a Puc1 y tres ciclinas tipo B Cig1, Cig2 y Cdc13. Para su acoplamiento con Cdc2, las ciclinas reconocen un motivo conocido como PSTAIR, que corresponden a los aminoácidos conservados en este dominio (Jeffrey *et al.*, 1995; Pavletich, 1999). A lo largo del ciclo, la cantidad de Cdc2 permanece constante mientras que los niveles de las ciclinas oscilan, lo que implica que la actividad específica de Cdc2 es determinada en parte por su ciclina asociada. De esta forma, Puc1 se une a Cdc2 para regular la entrada a fase S, Cig1 y Cig2 para regular la progresión por fase S y Cdc13 la entrada a mitosis (Fisher y Nurse, 1995). Cig2 es la principal ciclina en la fase de replicación del ADN, la cual se acumula durante la fase G1 tardía y desaparece a la salida de la fase S (Mondesert *et al.*, 1996). En el caso de Cdc13, sus niveles se mantienen bajos durante la fase G1, incrementan en

*al.*, 1989). Adicional a su caja de ciclinas, esta contiene un motivo de destrucción (del inglés *destruction-box motifs*) que dirige su proteólisis en dos pasos, ubiquitinación y degradación por parte del complejo APC-Ste9 y del proteosoma 26S respectivamente (Yamaguchi *et al.*, 1997; Kitamura *et al.*, 1998). Cdc13 y Cdc2 colocalizan en el núcleo. Aunque Cdc2 no se degrada durante la mitosis, en ausencia de Cdc13, esta no se localiza en el núcleo, indicando que Cdc13 no sólo regula la actividad de Cdc2 uniéndose a ella, sino que también regula su localización (Booher y Beach, 1989).

Por otro lado, a la salida de mitosis se acumula la proteína Rum1, un inhibidor de la actividad del complejo Cdc2-Cdc13 y Cdc2-Cig2, que se une físicamente a Cdc13 para dirigir su proteólisis durante la fase G1 (Correa-Bordes *et al.*, 1997). Cuando las células progresan desde fase G1 hacia fase S, el complejo Cdc2-Cig1 fosforila a Rum1 y promueve su degradación por el complejo SCF, lo que a su vez permite que el complejo Cdc2-Cig2 induzca la entrada en fase S y a su vez inhiba la actividad del complejo APC-Ste9 (Benito *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 2000). Otros estudios han señalado que el complejo Cdc2-Puc1 también fosforila a Rum1 a finales de la fase G1 (Martín-Castellanos *et al.*, 2000).

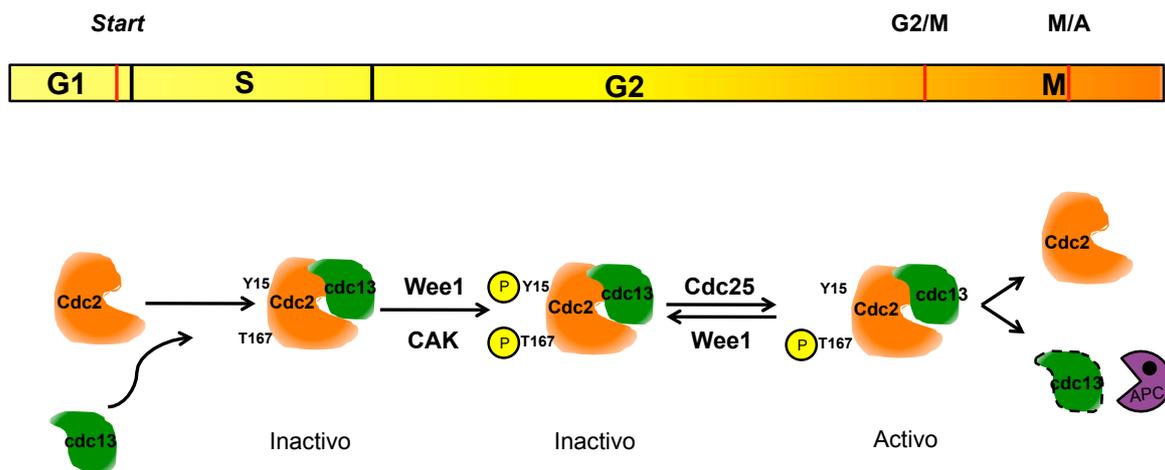
### 2.1.2 La fosforilación de Cdc2

En la levadura de fisión, el complejo Cd2-Cdc13 es regulado a través de una fosforilación activadora en el residuo Thr167 (T167) (Gould *et al.*, 1991; Fleig *et al.*, 1992), equivalente a la Thr169 en *S. cerevisiae* y la Thr161 en la Cdk de mamíferos, y de una fosforilación inhibitoria en el residuo Tyr15 (Y15) cercano al sitio de unión del ATP (Gould y Nurse, 1989).

En un primer evento, la T167 es fosforilada tras de la unión de Cd2 a Cdc13 (Gould *et al.*, 1991). La T167 esta ubicada dentro del T-loop de la quinasa y su fosforilación induce un reordenamiento en el sitio de unión a sus sustratos y a su vez fortalece la interacción con la ciclina (Ducommun *et al.*, 1991; Russo *et al.*, 1996). Esta fosforilación es catalizada por enzimas llamadas quinasas activadoras de la Cdk (CAKs, del inglés **CDK-Activating Kinase**) y no se encuentra regulada por modificaciones reversibles como normalmente ocurre en este tipo de modificaciones post-traduccionales. En *S. pombe* existen dos tipos de proteínas CAKs: el complejo esencial Mcs6, homólogo del complejo Cdk7-ciclina H en eucariotas superiores y Csk1, una proteína que no es esencial y es or-

## Introducción

tóloga de Cak1 en *S. cerevisiae*. Ambos activan a Cdc2, pero Csk1 a su vez es capaz de activar a Mcs6 (Damagnez, *et al.*, 1995 y Lee *et al.*, 1999). Por el contrario, también existen proteínas inhibidoras CKIs (del inglés *Cyclin dependent Kinase Inhibitor*), las cuales se unen *in vivo* a la Cdk, a la ciclina o el complejo Cdk/ciclina con el fin de impedir la activación de las CAKs o competir con la ciclina por la unión a la quinasa (revisado en Arellano y Moreno, 1997 y Blanco, 2001).



**Figura 2. Regulación por fosforilación del complejo Cdc2-Cdc13.** Durante la transición G1/S, la célula inicia la síntesis de la ciclina Cdc13, lo que permite que Cdc2 se una a ésta. A continuación la CAK fosforila la T167, esencial para su activación. La actividad del dímero es reprimida mediante la fosforilación en la Tyr15 por parte de Wee1 y Mik1. En la fase G2 la fosforilación en la Tyr15 es revertida por la fosfatasa Cdc25 para activar el complejo e inducir la entrada a mitosis. En la transición metafase/anafase el complejo Cdc2-cdc13 se inactiva por degradación de la ciclina.

En un segundo evento, establecido como el principal mecanismo de control de la entrada a mitosis, la quinasa Wee1 (Russell y Nurse, 1987a; Featherstone y Russell, 1991) y la fosfatasa Cdc25 (Millar *et al.* 1991), fosforilan y desfosforilan la Y15 respectivamente. Igualmente, como un sistema de reserva, la quinasa Mik1 (Lundgren *et al.*, 1991) y la fosfatasa Pyp3 (Millar *et al.*, 1992), cumplen un papel secundario al desempeñado por Wee1 y Cdc25 comparativamente. La fosforilación en la Y15 es importante para la coordinación entre la replicación y la entrada a mitosis, ya que dicho *checkpoint* promueve esta fosforilación para prevenir la activación de la Cdk antes de que el ADN este totalmente replicado (O'Connell *et al.*, 1997) (Figura 2).

## 2.2 Reguladores de la Cdk

### 2.2.1 La quinasa Wee1

La quinasa Wee1 actúa como un elemento regulador negativo de la entrada a mitosis. La inactivación de esta, provoca la división celular a un tamaño celular reducido (Nurse y Thuriaux, 1980) mientras que la sobreexpresión genera células alargadas (Russell y Nurse, 1987a). El primer inhibidor de Wee1 aislado en *S. pombe* fue Cdr1, también conocido como Nim1 (del inglés *New Inducer of Mitosis*) (Russell y Nurse, 1987b). De acuerdo a evidencias genéticas en las cuales, la sobreexpresión de Cdr1 rescata el fenotipo de células que carecen de *cdc25<sup>+</sup>* e induce a las células a entrar a mitosis prematuramente y por el contrario, la pérdida de *cdr1<sup>+</sup>* retrasa la mitosis e incrementa la longitud de las células, se propuso que Cdr1 actúa como un regulador positivo de la mitosis. Parker *et al.*, (1993) demostraron que Cdr1 es una quinasa que inhibe a Wee1 mediante una fosforilación directa. Más adelante, Kanoh y Russell, (1998) identificaron a Cdr2, un homólogo de Cdr1, mediante un escrutinio de sintéticos letales con *cdc25-22* a 25°C. En el mismo sentido que *cdr1<sup>+</sup>*, la delección de *cdr2<sup>+</sup>* genera un retraso en la transición G2/M más severo que la de *cdr1<sup>+</sup>*. Estas mismas conclusiones fueron avaladas por Breeding *et al.*, 1998.

A partir de esto, Cdr2 cobró importancia frente a Cdr1 y los mecanismos moleculares de su regulación se dilucidaron con los trabajos de Martin y Berthelot-Grosjean (2009) y Moseley *et al.*, (2009). Sus conclusiones, permitieron identificar una nueva ruta de señalización que acopla la percepción entre el tamaño celular y la división celular en *S. pombe*. Como parte de estos resultados, ambos grupos identificaron a Pom1, una quinasa reguladora de la actividad de Wee1 que actúa por encima de Cdr1/Cdr2. La actividad de Pom1 depende de su abundancia y localización a lo largo del córtex celular, es decir que de acuerdo a su modelo, en una célula pequeña, Pom1 se dispone en un gradiente de concentración que provienen desde los polos, para inhibir a Cdr1 y Cdr2 que se localizan en ese momento en la región media. Pero, cuando la célula alcanza un tamaño óptimo, los niveles descienden, permitiendo que la inhibición de Wee1 por parte de las dos quinasas se lleve a cabo. Entonces, de acuerdo su modelo, Pom1 desde los polos proporciona una medida de la longitud celular para regular la entrada a mitosis mediante la ruta de señalización Pom1-Cdr2-Cdr1-Wee1-Cdc2, la cual constituye una cascada de quinasas que debe apagarse para promover la entrada mitosis.

## Introducción

Recientemente, se ha identificado una nueva proteína llamada Nod1 cuya función es controlar el tamaño celular en el momento de la división. La delección de *nod1+* genera células alargadas e interacciones genéticas con los reguladores de Wee1. Su papel biológico consiste en reclutar el factor intercambiador de nucleótido de guanina Gef2 y a su vez ensamblarlo en el anillo de citoquinesis. El modelo planteado sugiere que la ruta Gef2-Mid1-Blt1 activa a Wee1 en interfase (Jourdain *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta estos estudios y otros, actualmente se sugiere que los factores que coordinan el tamaño celular con la entrada a mitosis, son factores que actúan por encima de Wee1 y a su vez participan en el sitio de división. Entre estos factores, se encuentran Cdr2, Cdr1, Gef2, Klp8, Blt1, Mid1, Nod1, Skb1, Nif1 y Fin1 (Wu y Russell, 1997; Paoletti y Chang, 2000; Morrell *et al.*, 2004; Moseley *et al.*, 2009; Martin y Berthelot-Grosjean, 2009; Ye *et al.*, 2012; Grallert *et al.*, 2012; Jourdain *et al.*, 2013; Deng y Moseley, 2013).

Aunque Wee1 fue identificado por primera vez en *S. pombe*, pocos estudios han sido realizados sobre su regulación espacio-temporal, en comparación con otros organismos. Wee1 es una proteína nuclear (Aligue *et al.*, 1997), que en la fase G2 tardía se localiza cerca de una estructura homóloga al centrosoma en levaduras, conocida como cuerpo polar del huso (del inglés **Spindle Pole Body, SPB**). De esta forma, su localización temporal en el SPB tiene como fin mantener inactiva a Cdc2-Cdc13 y a su vez evitar el ensamblaje del huso mitótico (Masuda *et al.*, 2011). Esta última función, es asociada con la inactivación de Plo1 (Polo quinasa), sobre la cual se ha sugerido que podría participar en un sistema de retroalimentación positivo, en el cual Plo1 aumenta la actividad de Cdc25 a través de su propia activación por Cdc2 (Mulvihill *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2001), de igual manera como se ha observado en células animales (revisado en Perry y Kornbluth, 2007).

### 2.2.2. La quinasa Mik1

Mik1 fue identificada como una quinasa relacionada a Wee1. Las primeras evidencias genéticas que la situaron como un elemento regulador de la entrada a mitosis fueron, primero que la delección de *mik1<sup>+</sup>* no manifiesta ningún fenotipo y sin embargo la eliminación de esta en un fondo que carece de actividad Wee1 provoca letalidad (*wee1-50 mik1Δ*) y segundo que esta letalidad puede ser rescatada por mutaciones en Cdc2 (Lundgren *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1994). No obstante, a partir de estas evidencias aún se pensaba que Mik1 simplemente sustituía la ausencia de Wee1.

Más adelante, Mik1 fue catalogada, más que como una proteína redundante a Wee1, como una quinasa cuya función era cooperar con Wee1 para prevenir una entrada prematura a mitosis. En el caso de Wee1, esta controla el acoplamiento entre el tamaño y la división celular, ya que se ha visto que las células de los mutantes *wee* entran a mitosis más pequeñas. Sin embargo, en el caso de las células mutantes de *mik1Δ* esto no sucede. El mutante *mik1Δ* sólo manifiesta fenotipo en ausencia de *wee1+*, el cual es conocido como catástrofe mitótica (Russell y Nurse, 1986). Esto implica que Mik1 no acopla el crecimiento a la división celular pero si la replicación del ADN a la entrada a mitosis. En apoyo a esta idea, se ha visto que Mik1 es regulada positivamente por el *checkpoint* del daño en el ADN, incrementando sus niveles a través de la quinasa Chk1 (Baber-Furnari *et al.*, 2000). En la actualidad, se conoce que *mik1+*, es un gen que es regulado por el factor de transcripción MCB-DSC1, (del inglés *Mlul Cell cycle Box- DNA Synthesis Control*), equivalente a E2F en mamíferos, el cual controla la expresión de otros genes en la transición G1/S, con el fin de prevenir una mitosis prematura en las células de *S. pombe* (Ng SS *et al.*, 2001). La reunión de todas estas observaciones ha permitido definir un papel más que secundario para Mik1, en el cual esta inhibe la actividad del complejo Cdc2-Cdc13 a través de la fosforilación de Y15 con el fin de impedir la progresión hacia mitosis mientras la replicación del ADN no esté finalizada. De aquí, que la función de Mik1 se encuentre conservada a lo largo de la evolución, al igual que su expresión periódica en el ciclo celular (Fernández *et al.*, 2012).

### 2.2.3 La fosfatasa Cdc25

Cdc25 es la principal fosfatasa que revierte la fosforilación de la Y15 de Cdc2 por parte de Wee1 y Mik1. Es una proteína esencial y conservada (Russell, *et al.*, 1989; Sadhu *et al.*, 1990; Kakizuka *et al.*, 1991; Millar *et al.*, 1991). Con las primeras observaciones en mutantes termosensibles *cdc25-ts*, cuyas células mueren bloqueadas en G2 y que a su vez, dicho fenotipo puede ser rescatado por mutantes *wee*, se despertó el interés sobre Cdc25, como una proteína implicada en el control mitótico en *S. pombe* (Fantes, 1979; Russell y Nurse, 1986; Russell *et al.*, 1989). Cdc25 se acumula en el núcleo en G2 (Moreno *et al.*, 1990; López-Girona *et al.*, 1999). En ausencia de Cdc25, Pyp3 puede compensar su función aunque de forma menos eficiente (Millar *et al.*, 1992).

En *Xenopus* y humanos, se ha demostrado que la actividad de Cdc25 es regulada a través de fosforilaciones por parte del complejo Cdk-ciclina B y por quinasas tipo polo, las

## Introducción

cuales son importantes para iniciar el sistema de retroalimentación positivo de activación de Cdk1 (Hoffmann *et al.*, 1993; Qian *et al.*, 2001). De igual manera, Cdc25 también es regulada por fosforilaciones inhibitorias cuando el ADN está dañado o cuando aún no ha sido replicado en su totalidad. En estos casos, Cdc25 es fosforilada por dos quinasas, Chk1 y Cds1 (Furnari *et al.*, 1997; Zeng *et al.*, 1998), las cuales promueven que Cdc25 sea excluida del núcleo (Kumagai y Dunphy, 1999). En células de mamíferos se ha visto que el complejo 14-3-3 (Rad24 y Rad25) asegura que Cdc25 no sea desfosforilado durante el bloqueo, por lo que la proteína se estabiliza y se inactiva.

En general, la regulación de Cdc25 ha sido estudiada en detalle empleando como modelo biológico a *Xenopus* y humanos. Recientemente, se han hecho aportes para *S. pombe* en ese sentido. Mediante análisis mutagénicos, se ha evaluado los aportes de las fosforilaciones de la Cdk sobre Cdc25 (Lu *et al.*, 2012). De acuerdo a su modelo experimental y matemático, Cdc25 es fosforilada en múltiples sitios por la Cdk con el fin de dirigir con precisión la entrada a mitosis, pero no regular su abundancia ni su localización.

En relación a la degradación de Cdc25, la fosfatasa Clp1, homóloga a la familia de fosfatasas tipo Cdc14 en mamíferos, desfosforila a Cdc25 a la salida de mitosis, desestabilizándola y dirigiéndola hacia su degradación a través del complejo promotor de la anafase APC (Esteban *et al.*, 2004). En esta degradación también participan las ubiquitina ligasas Pub1 y Pub2, las cuales prolongan la desestabilización de Cdc25 (Nefsky y Beach, 1996; Esteban *et al.*, 2004).

Análisis genéticos en *S. pombe*, han demostrado que existe una conexión entre el control de la entrada a mitosis a través de Cdc25 y la respuesta a estreses ambientales. En respuesta a cambios nutricionales, la MAP quinasa Sty1, componente de la ruta de respuesta a estrés (SRP), es capaz de activar a Cdc25 a través de Polo quinasa en el SPB (Shiozaki y Russell, 1995a; 1995b; Petersen y Nurse, 2007). En este sentido, la SRP induce la fosforilación de Plo1 en la S402, y a su vez promueve el reclutamiento de esta en el SPB (Figura 4). Dicho reclutamiento es mediado por Cut12, de ahí que mutantes deficientes en la actividad de Cdc25 sean capaces de progresar a mitosis por hiperactivación de Cut12 (Petersen y Hagan 2005). En otro contexto, la quinasa Srk1 interactúa con Cdc25 y la fosforila en los mismos sitios de fosforilación que Chk1 y Cds1, provocando la acumulación de esta en el citoplasma en respuesta a estrés osmótico, e

incluso en un ciclo celular sin perturbaciones (López-Avilés *et al.*, 2005).

### **2.3 Los puntos de control (*checkpoints*) del ciclo mitótico**

El ciclo celular en la levadura de fisión y en la mayoría de los organismos está coordinado por tres puntos de control que residen en la transición G1/S, G2/M y metafase-anafase.

#### **2.3.1 Transición G1/S**

Este punto de control se sitúa antes de la entrada en fase S. En las levaduras se denomina *Start* (del inglés, inicio) y en células animales punto de restricción. En este punto se coordina la maquinaria del ciclo celular con el crecimiento y la disponibilidad de nutrientes. El principal regulador de esta fase, es la proteína Rum1, la cual se encarga de inhibir la asociación del complejo Cdc2-Cdc13 y Cdc2-Cig2. Una vez las células alcanzan un tamaño crítico, se produce la degradación de Rum1 y la consecuente progresión hacia fase S.

#### **2.3.2 Transición G2/M**

Debido a que las células de *S. pombe* pasan el 70% del ciclo celular en fase G2, esta transición es la más significativa. La fosforilación de la Y15 de la Cdc2 mantiene las células en fase G2, al menos hasta que repliquen todo el genoma y alcancen un tamaño adecuado. Una vez superado estos requisitos, la desfosforilación de la Cdc2 y a su vez la entrada a mitosis es irreversible. En un ciclo celular sin perturbaciones, el control de tamaño opera muy cerca de la entrada a mitosis y a su vez constituye la interfase de comunicación entre la maquinaria del ciclo celular y el ambiente que rodea a la célula.

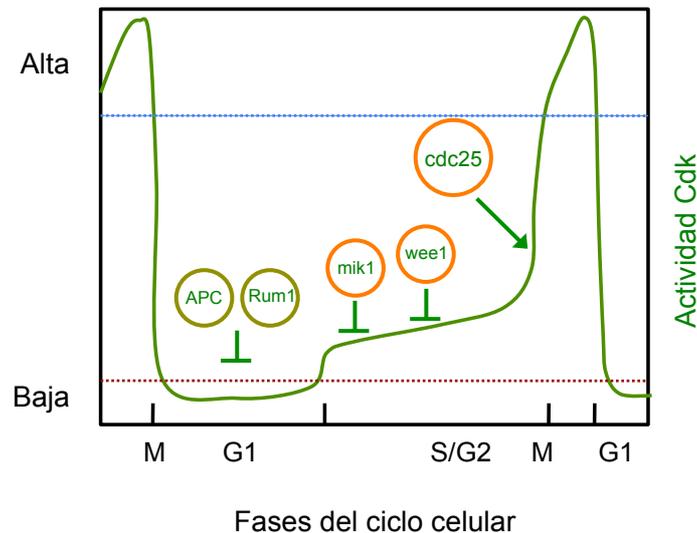
#### **2.3.3 Transición Metafase-Anafase**

La degradación de Cdc13 se inicia cuando se produce el alineamiento correcto de los cromosomas en la placa metafásica. Dicho evento, en conjunto es llevado a cabo por la degradación de securina, que permite la activación de la separasa, para a su vez degradar las cohesinas que mantienen unidas las cromátides hermanas. Este punto de control mitótico asegura que la activación del complejo APC sólo ocurra, una vez todos los tres cromosomas estén unidos adecuadamente al huso mitótico. Una vez superado este punto, la inactivación de la Cdk induce el desensamblaje del huso, la inactivación de

## Introducción

la maquinaria de segregación cromosómica y por último la descondensación de los cromosomas.

### 2.4 Un único oscilador mitótico



**Figura 3. Modelo matemático de la actividad de la Cdc2 a lo largo del ciclo celular.** En la fase G1, la actividad de la Cdk se mantiene muy baja a través del complejo APC y Rum1 (línea roja). Los niveles de la actividad de la Cdk aumentan levemente por la formación del heterodímero Cdc2-Cdc13, sin embargo se mantiene reprimida por la acción de Mik1 y Wee1. En la fase G2, la fosfatasa Cdc25 promueve la actividad de la Cdk hasta que alcanza los niveles máximos a la entrada de mitosis (línea azul) (Coudreuse y

En *S. pombe*, Stern y Nurse (1996) y Coudreuse y Nurse (2010) plantearon un modelo cuantitativo sobre el control de Cdc2 en fase S y mitosis. De acuerdo a este, diferentes niveles de actividad de Cdc2 regulan la progresión del ciclo celular. La fase S se inicia con un incremento de la actividad desde niveles basales a moderados con el fin de activar los orígenes de replicación del ADN. Seguidamente, la formación del complejo Cdc2-Cdc13 inhibe el reinicio de la fase S. En la fase G2, el incremento en cantidad de la Cdc13, eleva la actividad de la Cdk por limitación en sus inhibidores. Finalmente, un sistema de retroalimentación positivo, incrementa los niveles de actividad de la Cdk al máximo y provoca la entrada a mitosis. (Figura 3).

Según este modelo, la Cdk actúa como un oscilador con factores desencadenantes biestables. El término biestable se aplica a los sistemas de regulación, en los cuales la

retroalimentación tiene el potencial de llevar un sistema de un extremo a otro en poco tiempo. Este proceder como sistema biestable, a su vez atribuye la irreversibilidad de las transiciones, es decir que una vez se alcanza el umbral necesario de actividad, las células ya no pueden evitar la progresión hacia la siguiente fase (revisado en Morgan, 2007). Estudios en relación a esto, sugieren que el sistema de retroalimentación es esencial para evitar que las oscilaciones siguientes se debiliten y por ende se altere el orden y el tiempo del ciclo celular (revisado en Pomerening *et al.*, 2005).

Actualmente en *S. pombe*, se asume que en este sistema biológico se requiere un único oscilador mitótico, formado por el heterodímero Cdc2-Cdc13. El resto de ciclinas son prescindibles para regular este sistema biestable. Para probar esto, Coudreuse y Nurse, 2010, construyeron una proteína fusión Cdc2-Cdc13 regulada transcripcionalmente bajo el promotor de Cdc13, y a su vez delecionaron el resto de ciclinas. Aunque inicialmente, esta proteína aún es regulada por el sistema de proteólisis de la Cdc13, el inhibidor Rum1 y las fosforilaciones inhibitorias de Wee1 y Mik1, ellos demuestran que son innecesarios para promover los ciclos de replicación y mitosis en las células de *S. pombe*, siempre y cuando la actividad catalítica de la proteína fusión aún pueda ser regulable. Dicha regulación sobre la Cdk es posible, si la proteína fusión posee un alelo *as* (del inglés *analog-sensitive*), con el cual estos autores observaron que si se manipulan los niveles de la actividad de la Cdk, es posible inducir un ciclo celular con una secuencia de eventos errónea.

En resumen, el ciclo celular de *S. pombe* puede dirigirse con un único complejo Cdc2-Cdc13, sin embargo aún queda abierta la pregunta como un único oscilador podría mantener la conexión entre la división celular y las fluctuaciones en el ambiente extracelular.

### 3. Señales que controlan el ciclo celular

#### 3.1 Señales nutricionales

Bajo condiciones ricas en nutrientes, las células de *S. pombe* se dividen; sin embargo cuando se agotan los nutrientes, las células dejan de dividirse y se bloquean en fase G1 y si, conviven en el mismo entorno, células de tipo sexual opuestas, se induce la conjugación y posterior entrada a meiosis.

## Introducción

Actualmente en la mayoría de eucariotas, se asume que el principal elemento que controla la regulación del ciclo celular como respuesta a cambios nutricionales, es TOR (Target Of Rapamycin). Mediante un análisis genético en *S. cerevisiae*, TOR fue identificado como diana de la rapamicina, una droga empleada para inmunosuprimir pacientes trasplantados (Heitman *et al.*, 1991). El modo de acción de la droga consiste en que, ésta se une a la proteína FKBP12 (Fkh1 en la levadura de fisión) para formar un complejo, que a su vez inhibe a TOR. Las proteínas TOR han sido identificadas en la mayoría de eucariotas, sin embargo las levaduras poseen dos genes TOR (Tor1 y Tor2) y los animales solo uno (revisado en Jacinto, 2008). Tanto en levaduras como en mamíferos, las proteínas TOR forman parte de los complejos conocidos como TORC1 y TORC2 (Hara *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002). Los componentes de cada complejo son resumidos en la [Tabla 2](#).

**Tabla 2. Componentes de TORC1 y TORC2 en levaduras y mamíferos**

	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Mamíferos
TORC1	Tor2 Mip1 Wat1/Pop3 Tco89 Toc1 ---	TOR1 o TOR2 KOG1 LST8 TCO89 --- ---	mTOR Raptor mLST8 --- --- PRAS40
TORC2	Tor1 Sin1 --- Ste20 Wat1/Pop3 Bit61	TOR2 AVO1 AVO2 AVO3 LST8 BIT61	mTOR hSIN1 --- Rictor mLST8 PRR5

Información obtenida en Otsubo y Yamamoto, 2008.

En la levadura de fisión, TORC1 regula procesos como traducción, biogénesis de ribosomas, autofagia, transcripción y metabolismo, mientras que TORC2 regula la organización de la actina. TORC1, es sensible a rapamicina y TORC2 no. En general, la rapamicina no inhibe el crecimiento celular en *S. pombe*, pero sí afecta la conjugación, aunque no la entrada a fase estacionaria (Weisman *et al.*, 1997). El gen *tor1*<sup>+</sup>, no es esencial, sin embargo, su delección genera células alargadas y no permite que las células se bloqueen bien en fase G1, generando esterilidad. Tanto en mamíferos como en *S. cerevisiae*, se ha identificado el módulo de señalización TOR-PDK1-AGC quinasa, el cual es necesario para promover el crecimiento y el desarrollo sexual bajo situaciones de

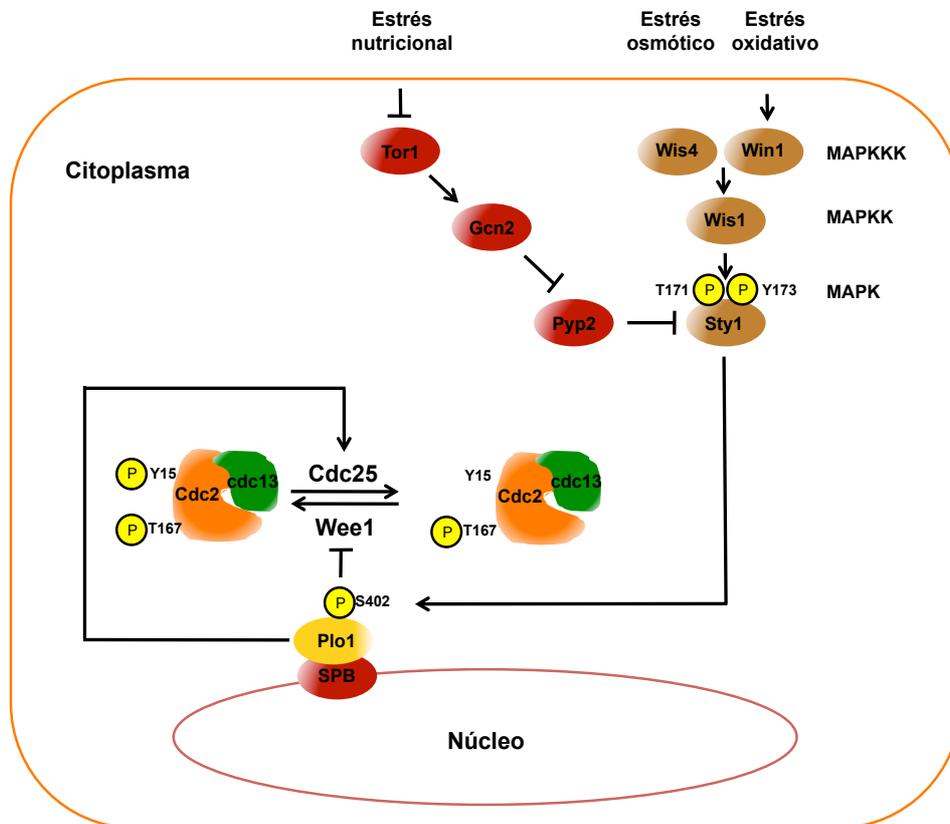
estrés. Dicho módulo en *S. pombe*, está compuesto por Tor1-Ksg1 (PDK1 homólogo) y Gad8 (AGC quinasa) (Matsuo *et al.*, 2003). Por el contrario, el gen Tor2, si es esencial para crecimiento vegetativo. Los mutantes termosensibles *tor2-ts* se bloquean en fase G1 a temperatura restrictiva, independiente del medio de crecimiento, y en un fondo sexual homotático su inactivación induce la conjugación prematuramente (Alvarez y Moreno *et al.*, 2006; Uritani *et al.*, 2006; Weisman *et al.*, 2007; Matsuo *et al.*, 2007). Asimismo, las GTPasas de la familia Rag han sido implicadas en la activación de TORC1 en *Drosophila* y mamíferos en respuesta a aminoácidos. En *S. pombe*, un ejemplo de esto es la GTPasa Rhb1 (homólogo de Rheb) la cual aumenta la actividad de Tor2, al igual que en células de eucariotas superiores. La ausencia de Rhb1 induce bloqueo en la fase G1 y la expresión de genes necesarios para la conjugación, debido a que se inactiva Tor2 (Matsuo *et al.*, 2007; Mach *et al.*, 2000). Otro ejemplo de esto, son las GTPasas Gtr1 y Gtr2, previamente activadas por el factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) Vam6, las cuales estimulan el crecimiento e inhiben la diferenciación sexual a través de la activación de Tor2 (Valbuena *et al.*, 2012). A partir de esto, se deduce que existe un módulo de activación de TOR conservado evolutivamente en los eucariotas.

De acuerdo a lo anterior, Tor1 y Tor2 parecen tener funciones opuestas. En apoyo a esta idea, en un análisis de expresión del mutante *tor2-ts*, se observó un incremento en la expresión de genes codificantes para permeasas y transportadores (Matsuo *et al.*, 2007) mientras que en el doble mutante *tor1Δ tsc2Δ* se redujo la expresión de los mismos (Weisman *et al.*, 2007), por lo que se propuso de igual forma, que Tor1 junto con Tsc1/2 regulan positivamente la incorporación de aminoácidos, mientras que Tor2 la regula negativamente. Sin embargo, otros resultados como que la ausencia de una no suprime el defecto de la otra, y que el fenotipo del doble mutante resulta en un efecto aditivo, sugiere que sus funciones podrían estar coordinadas (Ikai *et al.*, 2011).

Actualmente, en *S. pombe* se asume que la ruta de respuesta a estrés MAPK (SRP) conecta la señalización TOR y la progresión mitótica. Dicha conexión es relevante en el control de la entrada a mitosis, dependiente del estado nutricional de las células. Cuando las células de *S. pombe*, son transferidas desde una fuente rica en nitrógeno (glutamato) a una pobre (prolina), la actividad Tor1 se reduce y a su vez se induce la activación de Sty1 para promover entrada a mitosis a través de la activación de Cdc25 y Cdc2. Esto significa que las células proliferan, a través de la actividad de Tor1. Dicha actividad es llevada a cabo como parte del complejo TORC1, siendo la inhibición de Tor1 la que

## Introducción

promueve la entrada a mitosis bajo estrés nutricional (Figura 4) (Pertersen y Nurse, 2007; Hartmuth y Petersen, 2009).



**Figura 4. Señales que controlan el ciclo celular de *S. pombe*.** Como respuesta a cambios en la fuente de nitrógeno, el complejo TORC1 (Tor1) activa la quinasa Sty1 para favorecer la entrada a mitosis a través de la activación de Plo1 y Cdc25 en el SPB. Como respuesta a otros tipos de estrés, la cascada de MAP quinasas activa a Sty1 para favorecer la progresión mitótica de la misma forma.

La privación de nitrógeno también induce el estado de quiescencia, conocido también como estado G0, en el caso de que no haya células de tipo sexual opuesto. En *S. cerevisiae*, se conoce que TORC1 y PKA, son los elementos claves que regulan este estado y a su vez determinan la esperanza de vida o CLS (del inglés *Chronological LifeSpan*) de las células. Un descenso en la actividad de TORC1 y de la proteína quinasa A (PKA), causan un cese en el crecimiento junto con la entrada a quiescencia. Igualmente, las quinasas Snf1 y Pho85 actúan como reguladores de este programa celular (Wilson *et al.*, 1996; Wanke *et al.*, 2005). En *S. pombe*, la conexión molecular entre las rutas dependientes de la limitación de nitrógeno y/o glucosa y quiescencia permanecen poco exploradas. Sin embargo, dos trabajos recientes en el campo, sugieren

una conservación de los mecanismos moleculares del control de la quiescencia en ambos organismos. Zuin *et al.*, 2010 proponen que la activación de Sty1, dependiente de TORC1 y PKA es indispensable para prolongar la esperanza de vida de las células de *S. pombe* y Matsuzawa *et al.*, 2012, sugieren que Ssp2, la quinasa homóloga a Snf1, también actúa en la levadura de fisión, como un regulador del programa de transcripción dependiente de glucosa en fase exponencial.

De igual manera, PKA también cumple un papel importante en la coordinación del crecimiento y la división celular en *S. pombe*. PKA es una serina/treonina quinasa, cuya actividad depende de la concentración de AMP cíclico (cAMP). En general, los niveles de cAMP son altos cuando las células están creciendo exponencialmente y estos a su vez, dependientes de la adenilato ciclasa, una enzima que se encarga de catalizar la reacción de ATP (adenosin trifosfato) a AMPc. A altas concentraciones de cAMP, éste se une a la subunidad reguladora del complejo PKA, provocando la liberación de esta y exponiendo a su vez el sitio activo de la subunidad catalítica. Por el contrario, a bajas concentraciones de cAMP, la enzima permanece intacta y la subunidad catalítica continúa unida a la subunidad reguladora. En *S. pombe*, la adenilato ciclasa es codificada por el gen *cyr1<sup>+</sup>* y en el caso del complejo PKA, la subunidad catalítica es codificada por el gen *pka1<sup>+</sup>* y la reguladora por *cgs1<sup>+</sup>* (Maeda *et al.*, 1990; Maeda *et al.*, 1994). Los mutantes deficientes de *pka1<sup>+</sup>* y *cyr1<sup>+</sup>* presentan células más pequeñas e inician su programa de desarrollo sexual incluso en medio rico (Kawamukai *et al.*, 1991; Valbuena y Moreno, 2010). Por el contrario, los mutantes de delección *cgs1Δ* son estériles, ya que la actividad de PKA en estos mutantes es constitutivamente activa.

Cuando los niveles de glucosa son limitantes se inactiva PKA. Las células de *S. pombe* presentan un fenotipo *semi-wee* cuando las células crecen a una concentración de glucosa equivalente a las concentraciones de azúcar en la sangre de los humanos (4 mM; 0,08%). Cuando la glucosa se reduce hasta niveles de inanición (de 2,2 a 1,7 mM de glucosa disponible), se induce la entrada a quiescencia. Si la reducción de glucosa es progresiva, las células prolongan más su esperanza de vida (CLS) tras la quiescencia que aquellas sometidas a un cambio abrupto (revisado en Pluskal *et al.*, 2011). La quinasa Ssp1, homóloga de la quinasa dependiente de calcio y calmodulina en mamíferos (CaMK) junto con Sds23, un inhibidor de la fosfatasa tipo 2A y la relativa Ppe1, se han propuesto como elementos que actúan aguas abajo de la actividad de PKA en *S. pombe*, y que son necesarios para sobrellevar la proliferación celular bajo limitación

## Introducción

de glucosa y a su vez extender la viabilidad de la fase estacionaria (Hanyu *et al.*, 2009; Jang *et al.*, 2013).

### 3.2 Respuesta a estrés

Sty1 también cumple un papel en el control del ciclo celular frente a otros tipos de estrés ambiental tales como radiación UV, estrés osmótico, oxidativo, entre otros (Figura 4) (revisado en Petersen, 2009 y Pérez y Cansado, 2010). La activación de Sty1, en este contexto, está a cargo de dos reguladores aguas arriba de la MAPKK Wis1, llamados Wis4/Wak1 y Win1. Las células que carecen de estos reguladores, son incapaces de proliferar bajo estas condiciones de estrés (Shieh *et al.*, 1998). De esta forma, la cascada de quinasas Wis4-Win1-Wis1 (Módulo MAPK) controlan la activación de Sty1 en respuesta a varios tipo de estrés, pero no en respuesta a estrés nutricional, ya que se ha visto que en esta última caso su activación es dependiente de la quinasa Gcn2 y la fosfatasa específica de tirosinas Pyp2 (Petersen y Nurse, 2007). Bajo estrés térmico, la activación de Sty1 depende de la inhibición transitoria de otra fosfatasa de la misma familia, Pyp1. Después del estrés, para retornar a los niveles basales de Sty1, otras fosfatasas, pertenecientes a la familia tipo 2C, Ptc1 y Ptc3, se encargan de inactivar a Sty1 mediante la desfosforilación de la T171 (Nguyen *et al.*, 1999).

La activación de Sty1 ante situaciones de estrés es necesaria, no solo porque reajusta la progresión del ciclo celular y permite la adaptación de las células al estímulo, sino también porque induce la expresión de genes indispensables para la respuesta al estrés CESR (del inglés **Core Environmental Stress Response**), los cuales son dependientes de la actividad del factor de transcripción Atf1 (Takeda *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2003).

## 4. Antagonistas de la actividad Cdk-ciclina

En un sistema biestable, como el mencionado anteriormente, debe existir un evento de fosforilación y uno de desfosforilación que regule la estabilidad del mismo y su vez determine el estado de actividad de los sustratos implicados. La fosforilación de una proteína es un evento que debe ocurrir con rapidez y a su vez debe ser reversible. Este mecanismo requiere menos consumo energético que otros con síntesis y degradación,

por lo que la célula utiliza este sistema como uno de los principales de regulación para el ciclo celular, el crecimiento, el desarrollo, la supervivencia, etc. (revisado en Novak *et al.*, 2010).

La entrada y la salida de mitosis en *S. pombe*, es un buen ejemplo de procesos celulares que se basan en eventos de fosforilación y desfosforilación. Durante décadas, la regulación de esta transición se ha centrado en el papel de las Cdk y las ciclinas, sin embargo ciertos estudios han sugerido un papel importante para las proteínas fosfatasas, como antagonistas de la Cdk. En este contexto, la actividad de la Cdk, no sólo induce la entrada a mitosis sino que también dirige la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico, la unión de los cromosomas al mismo y finalmente la activación del complejo APC, que se mantiene inactivo por el SAC (del inglés *Spindle Assembly Checkpoint*) mediante la inhibición de Cdc20, otro componente del APC. Cuando los cromosomas se han alineado correctamente, se libera Cdc20 y se activa APC, el cual inicia una serie de eventos que permiten la salida de mitosis, incluyendo una oleada de desfosforilación, en parte dirigida por la degradación de Cdc13 y a su vez inactivación del complejo Cdc2-Cdc13. Por otra parte, durante esta salida, proteína fosfatasas terminan de contrarrestar la actividad de CDK, revirtiendo la fosforilación de sus sustratos.

Durante la última década, empleando diferentes modelos biológicos, se han realizado importantes avances en la definición de las funciones de las principales familias de fosfatasas, incluyendo la fosfatasa serina/treonina PP1 y PP2A y las fosfatasas específicas de tirosinas Cdc14, que podrán contribuir a la desfosforilación de los sustratos de la Cdk.

### **4.1 Fosfatasa tipo 2A (PP2A)**

La proteína fosfatasa tipo 2A o PP2A cumple funciones en la regulación de múltiples procesos como crecimiento celular, diferenciación, respuesta al daño del ADN y regulación de la progresión mitótica, siendo una de las fosfatasas más abundantes de células animales (revisado en Wurzenberger y Gerlich, 2011). Las holoenzimas PP2A comprenden una familia de serina/treonina fosfatasas, las cuales se componen de una subunidad catalítica (C), una subunidad estructural (A) y una subunidad reguladora (B) (Janssens *et al.*, 2008). Hasta ahora, en humanos se han identificado dos subunidades C

## Introducción

( $\alpha$  y  $\beta$ ), dos A ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y cuatro familias de subunidades B: B55/B, B56/B', B'' (PR72) y B''' (PR93) (Eichnorn *et al.*, 2009). En *S. pombe* se han identificado dos subunidades catalíticas  $ppa2^+$  y  $ppa1^+$  (Kinoshita *et al.*, 1990), una subunidad estructural esencial  $paa1^+$  y tres reguladoras  $pab1^+$ ,  $par1^+$  y  $par2^+$  (Kinoshita *et al.*, 1996) (Jiang y Halberg, 2000). De forma similar a las quinasas, estas fosfatasa poseen una subunidad catalítica (C) y una reguladora (B), junto con una estructural (A). Su actividad es regulada en función de la subunidad reguladora asociada y de eventos de fosforilación y metilación de la subunidad catalítica (Janssens y Goris, 2001) y en humanos se han identificado más de 70 complejos PP2A.

En vertebrados, el complejo PP2A-B56-Shugosina colocaliza en la región pericentromérica con el fin de mantener desfosforilado el anillo de cohesinas hasta la transición metafase-anafase y por consiguiente mantener unidas las cromátides hermanas (Hauf *et al.*, 2005; Kitajima *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006).

En *S. cerevisiae*, la salida de mitosis es controlada por el complejo PP2A-Cdc55, el cual promueve la retención de Cdc14 en el nucléolo mediante la desfosforilación transitoria de Net1 (Yellman *et al.*, 2006). Cdc14 es una fosfatasa dual encargada de dirigir la salida de mitosis a través de la inactivación directa de Cdk1 y a su vez de la desfosforilación de múltiples sustratos, previamente fosforilados por esta última, como reguladores del huso mitótico (Ase1), el complejo pasajero del cromosoma (Sli15) y el complejo APC/Cdc20 (Visintin *et al.*, 1998; Higuchi *et al.*, 2005; Mirchenko *et al.*, 2010). La función de Cdc14 no parece estar conservada en otros organismos, ya que en la levadura de fisión, el homólogo de Cdc14, Clp1/Flp1 contribuye al control de la citoquinesis y a la inactivación de Cdc25 (Cueille *et al.*, 2001; Esteban *et al.*, 2004).

En células animales, se ha observado *in vitro* que el complejo PP2A-B55 $\delta$  revierte fosforilaciones de Cdk1 (Mochida *et al.*, 2009). La inactivación de PP2A durante mitosis fue observada por primera vez en extractos de *Xenopus laevis* y más tarde fue confirmada en células humanas, sugiriendo que su actividad también es regulada. Un elemento clave de la regulación de la actividad de PP2A es la quinasa *Greatwall*, cuyo homólogo en mamíferos es conocido como MASTL (del inglés **M**icrotubule-**A**ssociated **S**er/Thr kinase-**L**ike). *Greatwall* regula la actividad de PP2A-B55 $\delta$  indirectamente, mediante la fosforilación de dos proteínas conocidas como Ensa y Arrp19, las cuales se unen al complejo y lo inhiben. Esto, induce dos eventos, por un lado la disminución de la

la actividad de la fosfatasa, y por ende la fosforilación de múltiples sustratos necesarios para la progresión hacia mitosis, y por otro lado la amplificación del sistema de retroalimentación positivo de la Cdk1-ciclina B (Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010; Mochida *et al.*, 2010; Manchado *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

En *S. pombe* se ha identificado a PP2A como una fosfatasa con múltiples funciones que incluyen regulación de la progresión hacia mitosis (Kinoshita *et al.*, 1990), de la citoquinesis (Jiang *et al.*, 2001; Lahoz *et al.*, 2010; Goyal y Simanis, 2012), de la segregación de los cromosomas (Kitajima *et al.*, 2006) y de la morfogénesis (Kinoshita *et al.*, 1996).

### 4.2 Fosfatasa tipo 1 (PP1)

PP1 es otra de las fosfatasas más abundantes en células animales y regula procesos como metabolismo del glicógeno, transcripción, polaridad celular, daño en el ADN y progresión del ciclo celular entre otros. Para su función es necesaria la formación de un heterodímero que contiene una de las cuatro isoformas, presentes en células animales, como PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta$ , PP1 $\gamma$ 1 y PP1 $\gamma$ 2 junto con una de las múltiples subunidades reguladoras existentes. En células humanas se han identificado cerca de 180 complejos PP1 (revisado en Wurzenberger y Gerlich, 2011). En este caso, la subunidad reguladora determina su especificidad de sustrato, su localización y su actividad fosfatasa (Virshup y Shenolikar, 2009).

En extractos de huevos de *Xenopus* y en células de ratón inmunodeplecionados para PP1, se ha descrito un retraso en la desfosforilación de los sustratos de CDK, sugiriendo un papel directo de PP1 como antagonista de la actividad CDK en salida de mitosis. Por otro lado, tanto en humanos como en *Xenopus*, se ha observado que las subunidades catalíticas de PP1 $\alpha$  y PP1 $\gamma$ 1 son negativamente reguladas por la Cdk, indicando un sistema de regulación conservado. Cuando la actividad Cdk es reducida, PP1 promueve una salida prematura de mitosis, ya que PP1 es capaz de autodesfosforilarse y liberarse de su inhibidor conocido como inhibidor 1 (Wu *et al.*, 2009). Debido a que en experimentos de copurificación de sustratos de Cdk, a partir de células de *Xenopus* o mamíferos, se ha observado interacción con PP2A pero no con PP1, es posible que su papel sea coordinar la actividad de PP2A más que desfosforilar sustratos Cdk directamente (revisado en Wurzenberger y Gerlich, 2011).

## Introducción

PP1 se ha propuesto como un potencial activador de la actividad de la PP2A-B55δ en la ruta *Greatwall*-Ensa-Arrp19, ya sea como activador directo de esta o como inhibidor de *Greatwall* y sus dianas, sin embargo esto aún no ha sido evaluado experimentalmente (revisado en Domingo-Sananes *et al.*, 2011).

El homólogo de PP1 en *S. pombe*, Dis2 se ha asociado a diferentes funciones como segregación de los cromosomas, reinicio del ciclo celular tras la activación del *checkpoint* del daño en el ADN y recientemente en la inhibición de la progresión hacia mitosis, sobre la cual se ha propuesto que Dis2 se encarga de mantener las células en fase G2 hasta que estén preparadas para dividirse, mediante el silenciamiento de la actividad del SPB, lugar dónde se generan señales importantes para la activación del sistema de retroalimentación de la Cdk (por ej. Plo1, Cdc25) (Grallert *et al.*, 2013). Esta última función, sugiere que PP1 más que un antagonista de la Cdk, es un cooperador que favorece que esta alcance sus niveles mas altos de actividad.

Debido a la variabilidad y redundancia de los complejos fosfatasas observada en diferentes modelos biológicos, todavía no es posible pensar en que exista un único complejo fosfatasa que se encargue de regular la progresión del ciclo celular, en un sentido opuesto al de los complejos Cdk-ciclinas.

# Objetivos

## Objetivos

1. Identificar la red de interacciones genéticas con *cdc2* y *wee1* mediante un escrutinio masivo de sintéticos letales (SGA), generados tras el cruce de la colección de mutantes de delección de *S. pombe* con los mutantes *wee1-50* y *cdc2-3w*.
2. Caracterizar la ruta *Greatwall*-Ensa-PP2A en *S. pombe*.

# Resultados

## Apartado I

## 1. Identificación de una red de interacciones genéticas asociadas al ciclo celular en *S. pombe*

En organismos eucariotas, el ciclo celular está regulado por una red de proteínas que aseguran el orden y la direccionalidad de los eventos de la división celular. Esta red de proteínas incluye principalmente a las ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (Cdks).

La levadura de fisión, *S. pombe*, posee una única y esencial Cdk, llamada Cdc2, que se asocia a cuatro diferentes ciclinas (Puc1, Cig1, Cig2, y Cdc13) dependiendo de la fase del ciclo (Hagan *et al.*, 1988; Bueno *et al.*, 1991; Bueno y Russell, 1993; Martín-Castellanos *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha descrito que Cdc13 es la única ciclina esencial para dirigir la ejecución completa del ciclo celular en este organismo (Fisher y Nurse, 1996; Martín-Castellanos *et al.*, 2000; Coudreuse y Nurse, 2010).

En general, en G2, Cdc2 se asocia a Cdc13 para promover la entrada a mitosis (Moreno *et al.*, 1989). Durante la fase S y la G2 temprana, la actividad del complejo Cdc2/Cdc13 se mantiene reprimida por la fosforilación en el residuo de la Y15, por parte de las quinasas Mik1 y Wee1 (Gould y Nurse, 1989; Featherstone y Russell, 1991; Lundgren *et al.*, 1991). Durante la fase G2 tardía, la fosfatasa Cdc25 desfosforila a Cdc2 en la Y15 y activa el complejo Cdc2-Cdc13, induciendo así la entrada en mitosis (Enoch y Nurse, 1991; Millar *et al.*, 1991). Más adelante, en anafase, Cdc13 se degrada por del complejo APC/Ste9, que mantiene bajos los niveles de Cdc13 (Blanco *et al.*, 2000). Igualmente, para mantener las células en fase G1 y evitar una entrada prematura en fase S, el inhibidor Rum1 se une físicamente a Cdc2 (Moreno y Nurse, 1994; Correa-Bordes y Nurse, 1995). Finalmente, cuando las células alcanzan un tamaño adecuado, se produce la inactivación de Ste9 y la degradación de Rum1, permitiendo una nueva formación del complejo Cdc2-Cdc13 y una nueva ronda del ciclo celular mitótico (Benito *et al.*, 1998; Kitamura *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 2000).

Lo anteriormente descrito constituye en *S. pombe* la capa primaria de regulación de la maquinaria central de su ciclo celular. No obstante, existen capas secundarias que conectan ésta maquinaria con otros procesos celulares que aún no han sido plenamente

## Resultados-Apartado I

descritas.

### 1.1 Escrutinio masivo de sintéticos letales (SGA)

El primer objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar una red de interacción genética global conectada directamente con la maquinaria del ciclo celular de *S. pombe*. Para abordar este objetivo, se empleó la técnica de genómica funcional *Synthetic Genetic Array (SGA) Analysis* (Tong *et al.*, 2001; Dixon *et al.*, 2008; Dixon *et al.*, 2009) y que en este estudio denominamos **Escrutinio Sistemático de Sintéticos Letales (SGA)**, con el fin de identificar genes cuyos productos están relacionados funcionalmente con el sistema Wee1-Cdc2-Cdc25.

Como punto de partida, se utilizaron dos mutantes de interés (del inglés *query mutant*) y 3346 mutantes diana (del inglés *target mutant*), los cuales sirvieron como herramienta en la construcción sistemática de los dobles mutantes necesarios para el análisis global de las interacciones sintéticas genéticas. En particular, se emplearon como **cepas de interés** los mutantes de ciclo celular *wee1-50* y *cdc2-3w* de *S. pombe* (Fantes, 1981; Russell y Nurse, 1986) y como **cepas diana** la colección de **mutantes de delección no esenciales de *S. pombe* v3.0**, generada por el consorcio KRIBB-Bioneer-CRUK (Kim *et al.*, 2010; Spirek *et al.*, 2010).

Dado que la colección de mutantes de delección fue construida con el marcador de selección *kanMX4*, con el fin de facilitar la selección de los dobles mutantes, se construyeron las cepas de interés *wee1-50:natMX6 leu1-32* (S2147) y *cdc2-3w:natMX6* (S2165) con el gen marcador *natMX6*, que confiere resistencia al antibiótico nourseotricina en *S. pombe*. Adicionalmente, para descartar problemas de crecimiento o de conjugación de los mutantes cepas diana, se construyó la cepa *wee1<sup>+</sup>:natMX6 leu1-32* (S2176) y se utilizó como control.

Inicialmente, para obtener la matriz de dobles mutantes las cepas de interés fueron cruzadas con los 3346 mutantes de delección no esenciales, que representan el 68% de los marcos de lectura abierta que codifican para una proteína en el genoma y el 93,5% de los genes no esenciales de *S. pombe* (Kim *et al.*, 2010). Seguidamente, se llevaron a cabo una serie de pasos que incluyeron: **i)** enriquecimiento de esporas a través de la eliminación de parentales haploides y diploides mediante estrés térmico, **ii)** germinación y

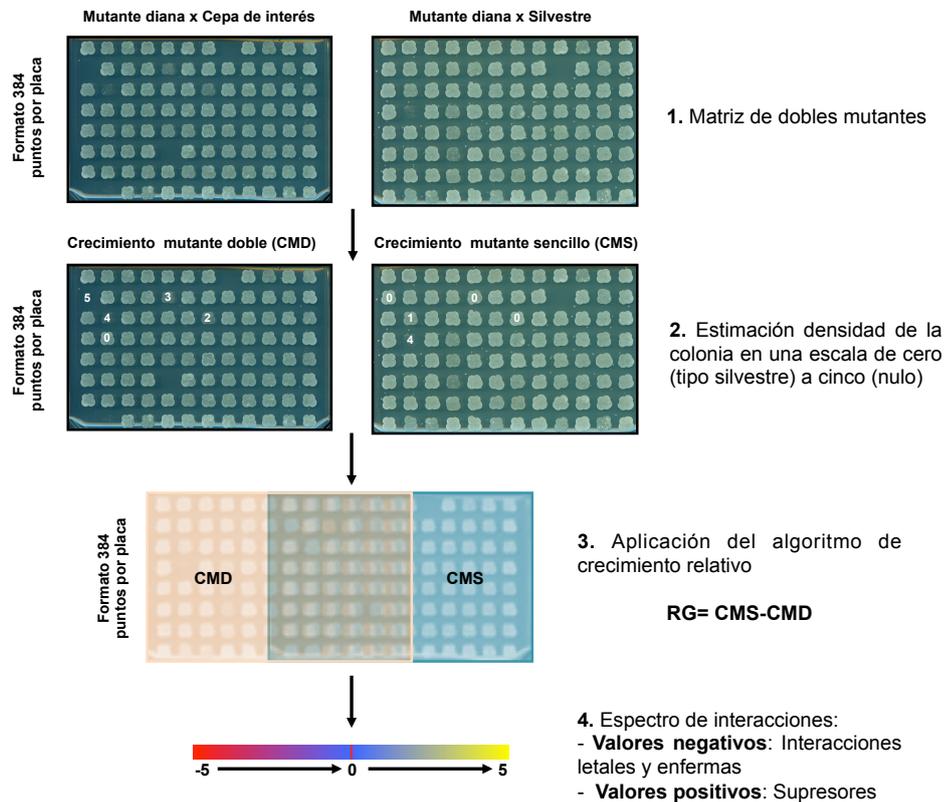
iii) dos rondas de selección de los dobles mutantes en medio líquido y sólido con G418 y ClonNat, con el fin de potenciar la selección (Ver Figura 1, sección 3.2.11 de Materiales y Métodos). En el caso de los cruces con el mutante *wee1-50*, el último paso de selección sobre agar se realizó a temperatura permisiva (25°C) y temperatura restrictiva (35°C) con el fin de evaluar el efecto de la inactivación de la quinasa *wee1+*, mientras que en el caso de los cruces con el mutante *cdc2-3w* se llevo a cabo a 25°C. Los dobles mutantes producto del cruce control se seleccionaron a ambas temperaturas.

### 1.2 Estimación del crecimiento relativo (RG) e identificación del espectro de las interacciones genéticas

Tras lo anterior, se obtuvieron matrices con los dobles mutantes ordenados en 96 puntos por cuadruplicado, lo cual aportó reproducibilidad a los resultados finales del escrutinio. A partir de estas matrices, se estimó visualmente el crecimiento de los dobles mutantes en comparación con su respectivo cruce control. La estimación relativo del crecimiento de los dobles mutantes se realizó en función de la densidad de la colonia y se definió teniendo en cuenta el crecimiento de cada mutación implicada (por ej. crecimiento de la cepa diana *versus* crecimiento de la cepa de interés) (Mani *et al.*, 2008; Phillips, 2008). Para esto, en primer lugar se asignó un valor de crecimiento a cerca de 17.000 colonias que correspondieron a los dobles mutantes producto de las cinco selecciones efectuadas en el escrutinio. El crecimiento se cuantificó mediante una escala arbitraria de puntuación que abarcó un rango entre cero y cinco, siendo cero el valor para un crecimiento tipo silvestre y cinco para un crecimiento nulo. Una vez estimados estos valores, se calculó el crecimiento relativo de los dobles mutantes, mediante una comparación cuantitativa entre el valor de crecimiento del mutante doble y el mutante diana, producto del cruce entre las cepas de la colección de mutantes de delección y la cepa silvestre, dónde el crecimiento del mutante doble (CMD) fue restado al crecimiento del mutante sencillo (CMS), tomando en consideración la misma temperatura de incubación para ambos crecimientos. Tras la aplicación del **algoritmo RG (del inglés *relative growth*)**, se obtuvo un rango de puntuación que delimitó el espectro de interacciones genéticas esperadas. Dicho rango comprendió valores negativos y positivos desde cero, con un máximo de cinco en ambos casos. En la Figura 1, se resume la estrategia empleada para identificar las interacciones genéticas. La interpretación de estos valores se hizo de acuerdo a los modelos propuestos por Mani *et al.*, 2008 y Phillips *et al.*, 2008. De tal manera que los valores negativos se obtuvieron cuando el doble

## Resultados-Apartado I

mostró un defecto en el crecimiento más extremo que el esperado, y los positivos cuando el doble mutante manifestó un crecimiento más rápido, clasificándose los primeros como sintéticos letales y sintéticos enfermos, y los segundos como supresores, que el esperado y se definieron como supresores.



**Figura 1.** Estrategia empleada para la identificación de los genes con interacciones negativas y positivas con *wee1-50* y *cdc2-3w*. Para esto, i) se construyeron las matrices con los dobles mutantes en formato de 384 puntos por placa a partir de los cruces entre los mutantes *wee1-50* y *cdc2-3w* y los 3346 mutantes de delección no esenciales de *S. pombe*, junto con el cruce control; ii) se estimó la densidad de la colonia empleando una escala arbitraria de cero a cinco, siendo cero un crecimiento silvestre y cinco un

La interpretación de estos valores se hizo de acuerdo a los modelos propuestos por Mani *et al.*, 2008 y Phillips *et al.*, 2008. De tal manera que los valores negativos se obtuvieron cuando el doble mutante mostró un defecto en el crecimiento más extremo que el esperado, y los positivos cuando el doble mutante manifestó un crecimiento más rápido, clasificándose los primeros como sintéticos letales y sintéticos enfermos, y los segundos como supresores, que el esperado y se definieron como supresores.

### 1.3 Validación de resultados y normalización de los valores de crecimiento

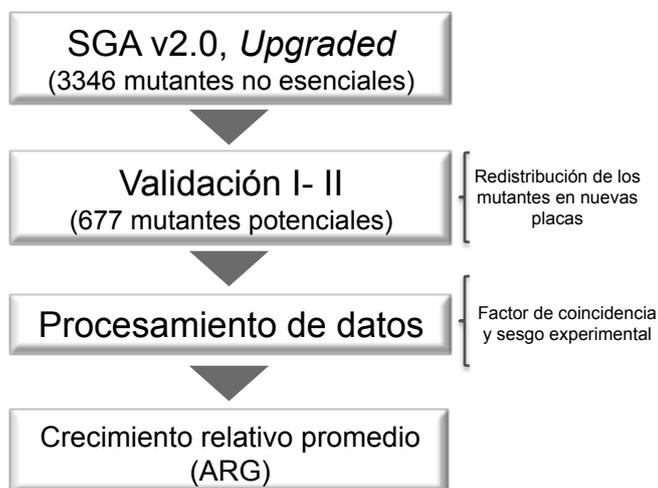
La versión 3.0 de la colección de mutantes de delección de *S.pombe* está comprendida por la versión 2.0 que incluye 3005 mutantes y la versión *Upgraded* que incluye 341 nuevos mutantes y 206 mutantes reconstruidos, que en su totalidad corresponden a los 3346 mutantes de delección de la versión mas actual que existe hasta el momento.

Para la realización del escrutinio, se dividió la v2.0 en tres grupos y junto con la versión *Upgraded*, se ejecutó la primera ronda del escrutinio en 4 fases. De los 3346 mutantes de delección escrutados, se identificaron 677 mutantes, que en combinación con el mutante *wee1-50* o *cdc2-3w* o ambos, manifestaron un fenotipo en la viabilidad celular alterado (Figura 2). En el caso de las cepas redundantes entre la v2.0 y la *Upgraded*, el valor de crecimiento por duplicado fue tenido en cuenta para determinar el efecto de la reconstrucción de las cepas sobre las interacciones.

En general, las interacciones fueron corroboradas repitiendo el SGA por duplicado (Figura 2). Los 677 mutantes se redistribuyeron manualmente en una nueva matriz de 96 pocillos y tras dos rondas de validación, se analizó el crecimiento relativo obtenido en cada caso. Para corregir sistemáticamente el sesgo en las observaciones e identificar los posibles falsos negativos o falsos positivos presentes, se tuvo en cuenta la reproducibilidad en las mediciones y la influencia de diferentes factores experimentales definidos para escrutinios de sintéticos letales a gran escala (Collins *et al.*, 2006; Baryshnikova *et al.*, 2010; Wagih *et al.*, 2013).

Los factores tenidos en cuenta en este estudio incluyen: i) efecto de la ejecución del escrutinio por fases (en inglés *specific batch effects*), ii) efecto de genes ligados, donde los dobles mutantes son raramente generados, iii) efecto del crecimiento cerca de colonias con una interacción negativa, donde las colonias tienen un mayor acceso a los nutrientes, exhibiendo un crecimiento mas rápido (en inglés *effect of neighbouring mutant*) y iv) efecto de borde, donde las colonias tienen mayor acceso a nutrientes y crecen mejor en comparación con las colonias del centro (en inglés *plate edge effect*). Asimismo, se tuvo en cuenta la coherencia entre los datos de crecimiento en líquido en YES y YES con G418 de las cepas de la colección y el cruce control.

## Resultados-Apartado I



**Figura 2.** Esquema de la estrategia de validación y normalización de los resultados obtenidos en el escrutinio de sintéticos letales. De 3346 mutantes no esenciales escrutados, se identificaron 677 mutantes potenciales cuyo crecimiento relativo fue validado mediante redistribución de los mutantes en nuevas placas

### 1.3.1 Efecto de la ejecución del escrutinio por fases

Para valorar la reproducibilidad de las validaciones del escrutinio, en primer lugar se aplicó un criterio que se denominó **factor de coincidencia**, en el cual se tuvo en cuenta para cada uno de los 677 mutantes identificados, las veces que se reprodujo su valoración de interacción negativa o positiva (RG) sin importar el valor absoluto. De esta manera se definieron, tres categorías para las interacciones negativas (SL) y tres categorías para las positivas (SUP), donde SL3 y SUP3 indica que el valor se reprodujo en las tres validaciones realizadas, SL2 y SUP2 en dos de las tres, y SL1 y SUP1 en una de la tres.

Todos los mutantes con un factor de coincidencia SL1 y SUP1 fueron descartados por manifestar un fenotipo de interacción ambiguo. Para los mutantes pertenecientes a la categoría SL3 y SUP3, se calculó la media aritmética con los tres valores de crecimiento estimados y se aproximó por exceso hacia la unidad, definiéndose así el **valor de crecimiento**

**relativo promedio** (del inglés *Averaged Relative Growth*). A continuación para las categorías SL2 y SUP2, se eliminó el valor alejado de la tendencia de los dos restantes y se calculó la media aritmética. Adicionalmente, para corregir la variabilidad entre los puntajes obtenidos por cada validación y el sesgo en el ARG, se midió el coeficiente de varianza (CV) (ver sección 3.3.3 de Materiales y Métodos).

### 1.3.2 Efecto de genes diana ligados al gen de interés

Para eliminar potenciales falsos positivos, se identificaron los **genes diana ligados a los genes de interés**, estableciendo 200 Kb como distancia crítica, de acuerdo a lo descrito por Collins *et al.*, 2010 para *S. pombe*. Entre los genes que formaron parte de la red de interacción de sintéticos letales con *wee1-50*, se descartaron cinco genes anotados en Pombase hasta la fecha como *aah3*, *ers1*, *rpl1202*, *wee1* y *SPCC16C4.10* entre los genes sintéticos letales con *cdc2-3w*, se suprimieron 19 genes anotados como *adn1*, *aht1*, *aim22*, *ask1*, *fic1*, *hhf2*, *hht2*, *mep33*, *pht1*, *rps402*, *sre1*, *tom7*, *shy1*, *ucp8*, *SPBC17A3.06*, *SPBC83.05*, *SPBC83.11*, *SPBC83.16c* y *SPBC83.17*.

### 1.3.3 Efecto de borde, espacial y del mutante vecino en la placa

Se analizó el efecto de borde y el efecto espacial en la placa, estimando la frecuencia de interacciones observadas, según el valor del RG por cada fila y cada columna de la placa empleada para la primera validación del escrutinio (8 filas x 12 columnas).

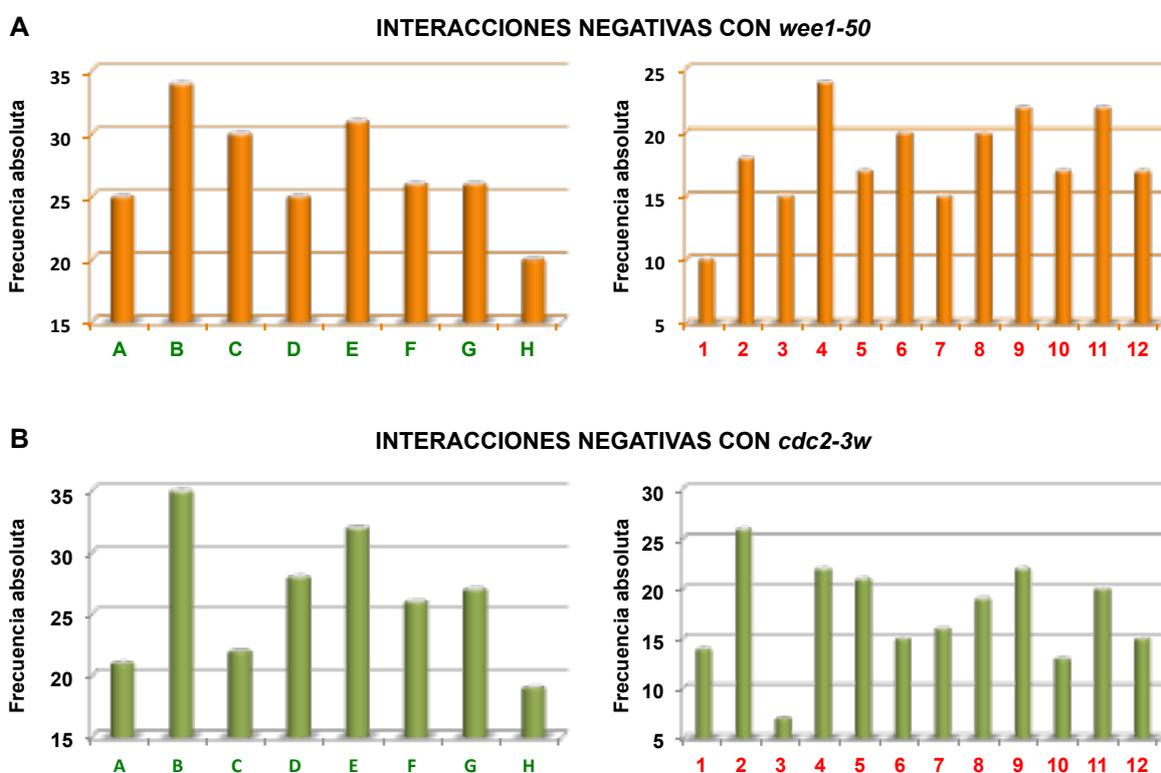
Según lo descrito por Wagih *et al.*, 2013 en un escrutinio masivo de interacciones genéticas se esperaba una reducción en el número de las interacciones negativas hacia los extremos de la placa por la mayor disponibilidad de nutrientes en comparación con el centro de la placa y a su vez un incremento de las interacciones positivas.

De acuerdo a la [Figura 3](#), los resultados de este análisis indicaron una ligera reducción en la frecuencia de las interacciones negativas observadas con *wee1-50* y *cdc2-3w* hacia el borde de la placa. Sin embargo, dicha reducción no coincidió con un incremento acusado de las mismas interacciones hacia el centro de la placa ni con un patrón de distribución que indicara un efecto espacial debido a cambios en el grosor del medio.

De igual forma, al analizar la distribución de las interacciones supresoras con *wee1-50* y *cdc2-3w* ([Figura 4](#)), no se observó un incremento significativo de estas asociado a la

## Resultados-Apartado I

reducción de las interacciones negativas hacia el borde de la placa ni a su vez con un efecto espacial. Por otra parte, para reducir el efecto de la colonia vecina durante el proceso de ejecución del escrutinio, antes de llevar a cabo la segunda y la tercera ronda de validación de los resultados, se reasignó manualmente una nueva posición a cada uno de los 677 mutantes identificadas preliminarmente. Dicho efecto fue observado en la primera ronda del escrutinio para algunas interacciones positivas, sin embargo no fue decisivo ya que muchas de las interacciones se reprodujeron en las siguientes validaciones.



**Figura 3.** Estimación de la frecuencia absoluta de las interacciones negativas identificadas con *wee1-50* (A) y *cdc2-3w* (B) por columnas (números) y filas (letras) de acuerdo a la manera como se ordena una placa de 96 pocillos.

Tras el análisis de los factores mencionados con anterioridad, se descartó el efecto espacial de placa y el efecto de borde como fuente de sesgo experimental y falsos resultados. La ausencia de estos efectos podría ser explicada por el tipo de metodología empleada en este escrutinio. Al contrario de un escrutinio robotizado donde la estimación del crecimiento se define en función del área de la colonia (Baryshnikova *et al.*, 2010), en

este escrutinio el uso de un replicador de 96 puntas de acero predefine el área de la colonia, y sólo permite la estimación del mismo en función de su densidad. De esta manera y de acuerdo a estos resultados, el efecto de borde y de placa afectaría el tamaño de la colonia pero no la densidad. Asimismo, es probable que el formato de 384 puntos (96 x 4) no genere tanta competencia en el crecimiento como el formato de 1536 colonias (32 x 84) de un escrutinio robotizado y en consecuencia que la frecuencia de las interacciones genéticas observadas aquí no se asocie a las perturbaciones metodológicas tratadas en este apartado. No obstante, el efecto de ejecución del escrutinio por fases, fue la principal fuente de falsos resultados, cuya influencia fue corregida no sólo mediante la normalización de los datos descrita en el apartado anterior sino mediante una inspección permanente de los resultados

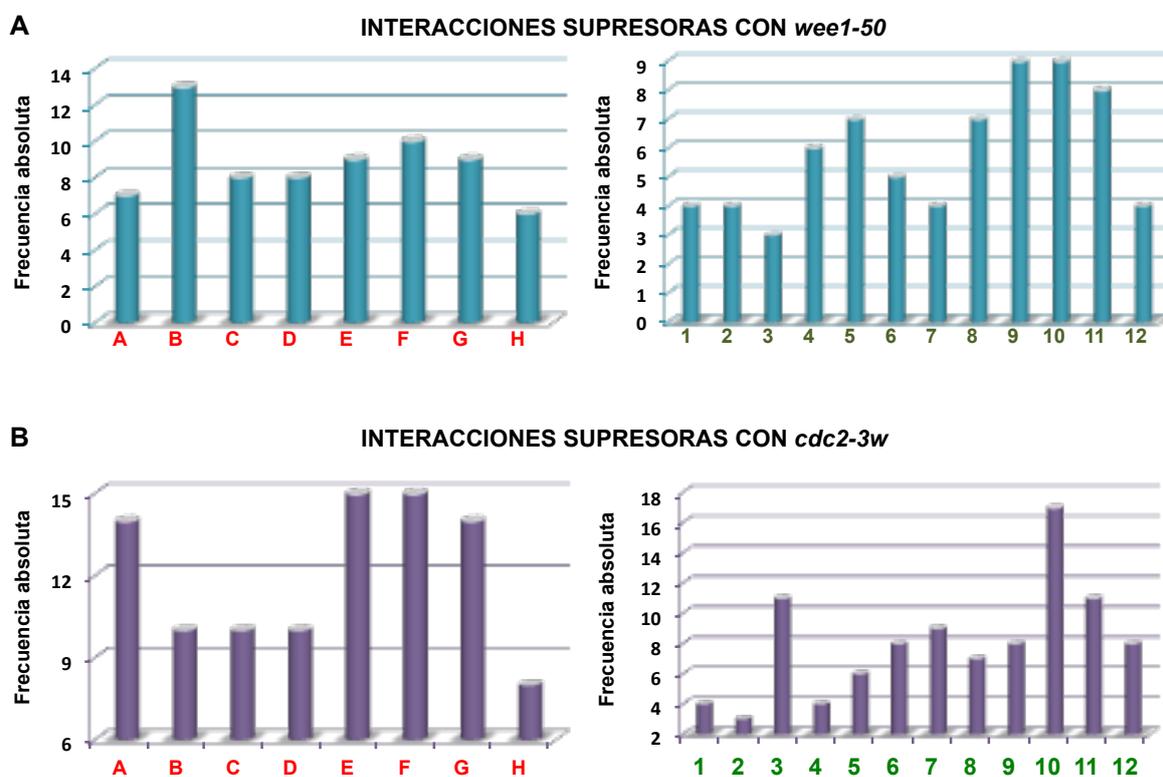


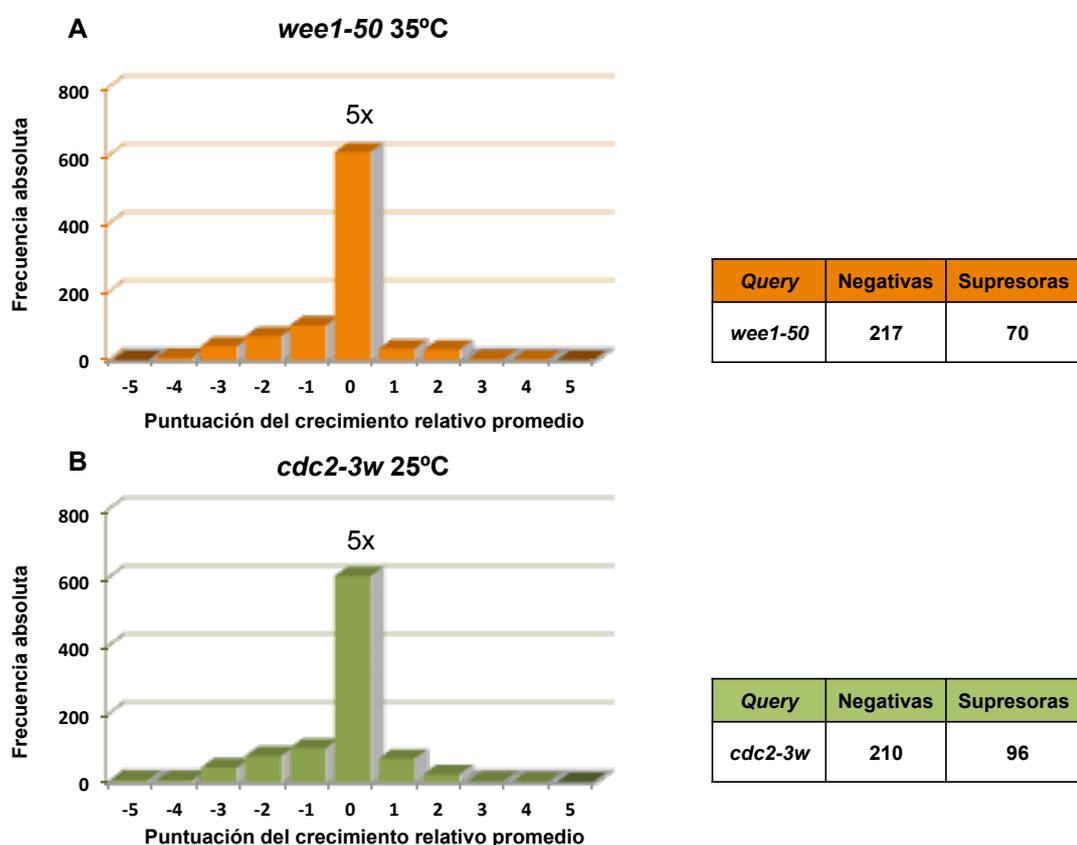
Figura 4. Estimación de la frecuencia absoluta de las interacciones positivas identificadas con *wee1-50* (A) y *cdc2-3w* (B) por columnas (números) y filas (letras) de acuerdo a la manera como se ordena una placa de 96 pocillos.

#### 1.4 Red de interacciones genéticas con los mutantes *wee1-50* y *cdc2-3w*

## Resultados-Apartado I

Tras la estimación del ARG en función de la reproducibilidad de la valoración de crecimiento relativo y la eliminación de potenciales falsos positivos por el efecto de ligación de los genes entre sí, se identificó y cuantificó el espectro de interacciones negativas y positivas para los mutantes de interés *wee1-50* a 35°C y *cdc2-3w* a 25°C (Figura 5).

En total, se identificaron 593 mutantes con interacciones genéticas, los cuales serán analizados en diferentes módulos para facilitar la comprensión de la red de interacción. En el módulo de interacciones negativas, se identificaron 217 mutantes que interactuaron con el mutante *wee1-50* a 35°C y 210 con el mutante *cdc2-3w* a 25°C. En el módulo de

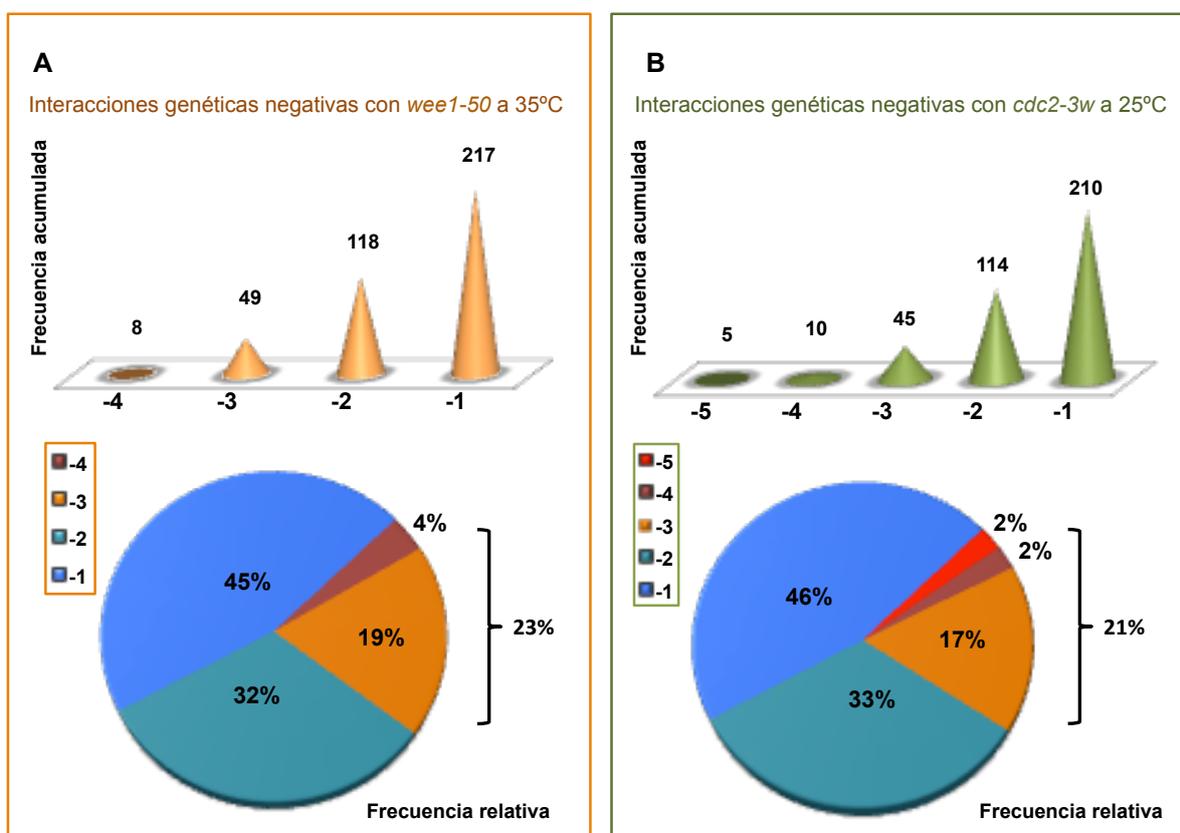


**Figura 5.** Estimación cuantitativa del espectro de interacciones genéticas identificadas para los mutantes de interés *wee1-50* (A) y *cdc2-3w* (B) mediante el escrutinio masivo de sintéticos letales (SGA). En el caso de las interacciones con un crecimiento relativo promedio igual a cero la frecuencia

En total, se identificaron 593 mutantes con interacciones genéticas, los cuales serán analizados en diferentes módulos para facilitar la comprensión de la red de interacción.

## Resultados-Apartado I

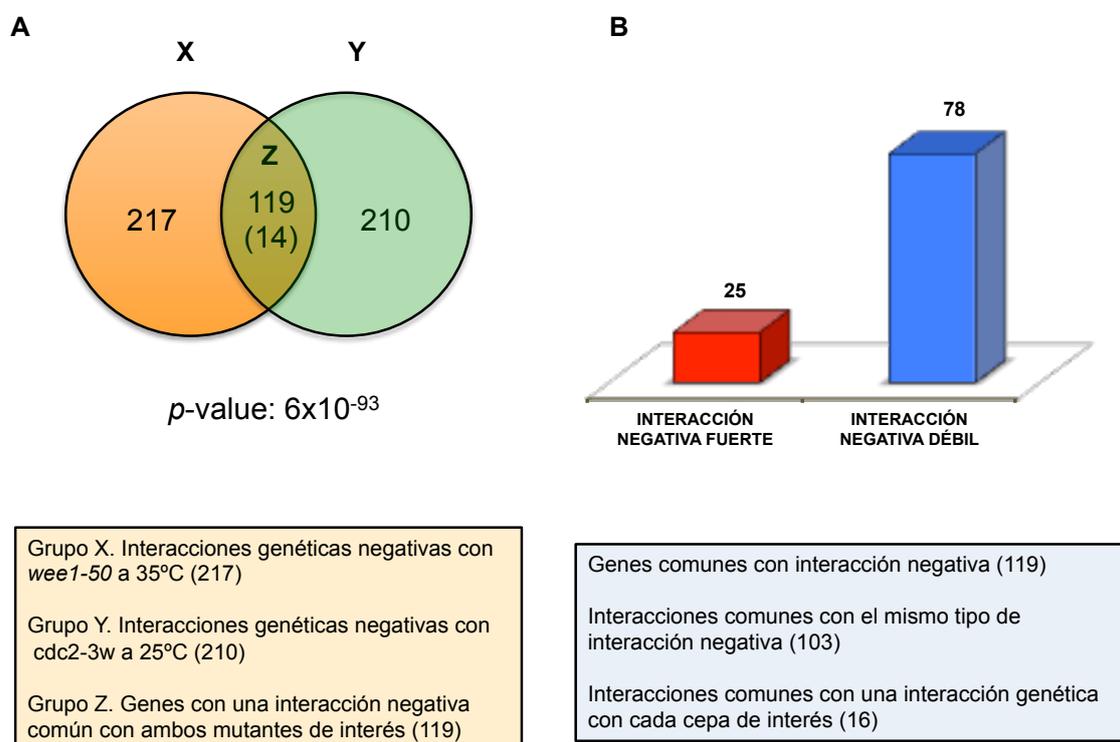
En el módulo de interacciones negativas, se identificaron 217 mutantes que interactuaron con el mutante *wee1-50* a 35°C y 210 con el mutante *cdc2-3w* a 25°C. En el módulo de las interacciones positivas, se identificaron 70 mutantes con *wee1-50* a 35°C y 96 con *cdc2-3w* a 25°C. De acuerdo a la [Figura 5](#), la distribución de las interacciones fue similar a un patrón de distribución normal con una ligera asimetría en ambos casos hacia las interacciones negativas. Para este escrutinio, sólo el 8% y el 9,14% de un total de 3346 mutantes de delección no esenciales para *S. pombe*, mostraron algún tipo de interacción genética con *wee1-50* y *cdc2-3w* respectivamente.



**Figura 6.** Estimación de la frecuencia absoluta acumulada y relativa de las interacciones negativas con *wee1-50* (A) y *cdc2-3w* (B), de acuerdo al crecimiento relativo promedio estimado. Las categorías más representadas en ambos casos corresponden a una puntuación comprendida entre -1 y -2. Las menos representadas entre -5 y -3 (23% con *wee1-50* y 21% con *cdc2-3w*).

Desglosando los módulos de interacción negativa, se observó que las **interacciones genéticas fuertes en un rango entre -5 y -3 para *wee1-50* y *cdc2-3w***, fueron menos frecuentes y solo estuvieron representados en un 23% y 21% respectivamente ([Figura 6](#)) y por el contrario que las **interacciones genéticas débiles, entre -2 y -1**, englobaron el 77% y el 79%.

## Resultados-Apartado I



**Figura 7. (A) Comparación entre las listas de los genes con interacciones negativas con *wee1-50* y *cdc2-3w*, encontrados en el escrutinio masivo de sintéticos letales.** El grado de solapamiento por azar fue de  $6 \times 10^{-93}$  y el número de interacciones en común esperadas de 14. **(B) Frecuencia y grados de**

Curiosamente, aunque el número de interacciones negativas para *wee1-50* fue similar al número para *cdc2-3w*, la red de interacción no es común a ambos. Al comparar las listas de los genes implicados, se observó que 119 de un total de 427 mutantes, compartía algún tipo de interacción con los dos mutantes de interés. Dicho número de interacciones en común, fue estadísticamente significativo de acuerdo al grado de solapamiento observado ( $p\text{-valor: } 6 \times 10^{-93}$ ) y al número de interacciones esperadas por azar (14) (Figura 7).

De los 119 genes observados como comunes, 103 mostraron el mismo grado de interacción para ambas cepas de interés, es decir que 25 de ellos mostraron una interacción negativa fuerte y 78 una interacción negativa débil tanto con *wee1-50* como con *cdc2-3w*. De los 16 mutantes restantes, 8 fueron fuertes con *wee1-50* y débiles con *cdc2-3w*, y 8 fuertes con *cdc2-3w* y débiles con *wee1-50* (Tabla 1).

**Tabla 1. Lista de genes en común con *wee1-50* y *cdc2-3w*, que manifestaron un grado de interacción genética diferente con cada cepa de interés.**

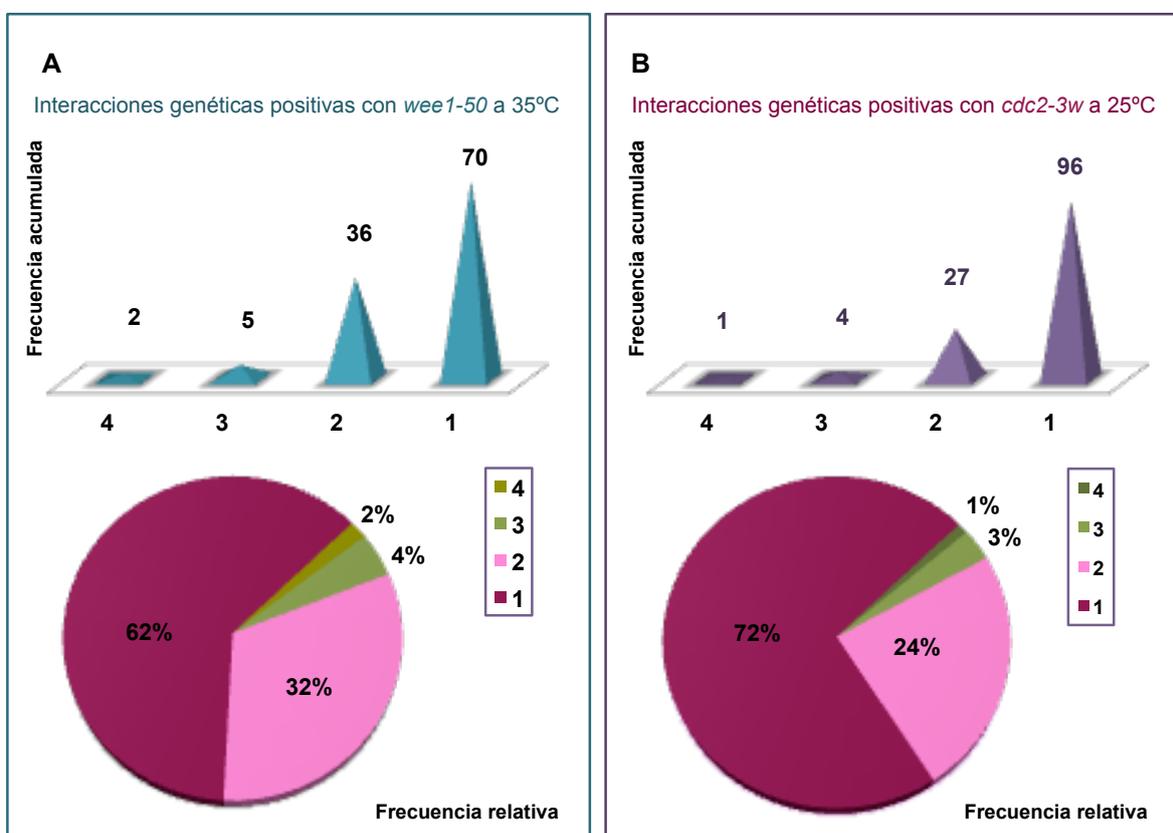
Nombre ORF	Nombre gen	Interacción <i>wee1-50</i> 35°C	Interacción <i>cdc2-3w</i> 25°C	Descripción funcional
SPBPB2B2.01	SPBPB2B2.01	Negativa Fuerte	Negativa Débil	Transportador de aminoácidos ( <i>amino acid permease predicted</i> )
SPAC6F6.01	<i>cch1</i>	Negativa Fuerte	Negativa Débil	Canal de calcio Cch1 ( <i>calcium channel</i> )
SPCC1223.15c	<i>spc19</i>	Negativa Fuerte	Negativa Débil	Subunidad Spc19 del complejo DASH ( <i>DASH complex subunit Spc19</i> )
SPAC222.14c	SPAC222.14c	Negativa Fuerte	Negativa Débil	Proteína de unión a GTP ( <i>GTP binding protein predicted</i> )
SPAC23A1.07	SPAC23A1.07	Negativa Fuerte	Negativa Débil	Proteína Ubiquitina ligasa E3 ( <i>ubiquitin-protein ligase E3 predicted</i> )
SPAC25G10.06	<i>rps2801</i>	Negativa Fuerte	Negativa Débil	Proteína 40S ribosomal S28 ( <i>40S ribosomal protein S28 predicted</i> )
SPCC550.14	<i>vgl1</i>	Negativa Fuerte	Negativa Débil	Proteína de unión a ARN ( <i>vigilin predicted</i> )
SPBC32F12.05c	<i>cwf12</i>	Negativa Fuerte	Negativa Débil	Proteína Cwf12 que forma complejo con Cdc5 ( <i>complexed with Cdc5 protein Cwf12</i> )
SPBP8B7.28c	<i>stc1</i>	Negativa Débil	Negativa Fuerte	Proteína de unión a cromatina ( <i>LIM-like protein linking chromatin modification to RNAi, Stc1</i> )
SPBC25H2.15	SPBC25H2.15	Negativa Débil	Negativa Fuerte	Proteína de maduración del SSU-rARN ( <i>SSU-rRNA maturation protein Tsr4 homolog 1 predicted</i> )
SPBC336.03	<i>efc25</i>	Negativa Débil	Negativa Fuerte	Factor de intercambio de GDP por GTP ( <i>Ras1 guanyl-nucleotide exchange factor Efc25</i> )
SPBC16C6.03c	SPBC16C6.03c	Negativa Débil	Negativa Fuerte	Proteína de ensamblaje del ribosoma ( <i>ribosome assembly protein predicted</i> )
SPBC16E9.14c	<i>zrg17</i>	Negativa Débil	Negativa Fuerte	Transportador de zinc en membrana ( <i>cation diffusion family zinc membrane transporter</i> )
SPBC29A3.05	<i>vps71</i>	Negativa Débil	Negativa Fuerte	Subunidad del complejo Swr1 ( <i>Swr1 complex subunit Vps71</i> )
SPBC3B9.13c	<i>rpp102</i>	Negativa Débil	Negativa Fuerte	Proteína ribosomal 60S ( <i>60S acidic ribosomal protein A3</i> )
SPBC83.18c	<i>fic1</i>	Negativa Débil	Negativa Fuerte	Proteína con dominio C2 ( <i>C2 domain protein Fic1</i> )
SPAC660.11	<i>tcg1</i>	Supresor fuerte	Supresor débil	Proteína de unión a ARN ( <i>single-stranded telomeric binding protein Tgc1</i> )
SPAC23C11.04	<i>pnk1</i>	Supresor fuerte	Supresor débil	Quinasa/fosfatasa ( <i>DNA Kinase/phosphatase</i> )
SPAC824.04	SPAC824.04	Supresor débil	Supresor fuerte	Proteína de unión a ARN ( <i>WD repeat protein predicted</i> )

En el análisis de los módulos con interacciones positivas, se observó el mismo patrón descrito para las interacciones negativas, donde las interacciones positivas débiles fueron mas frecuentes que las fuertes. De esta manera, del total de genes identificados con un *wee1-50*, el 94% correspondió a las **interacciones positivas débiles** (puntuaciones

## Resultados-Apartado I

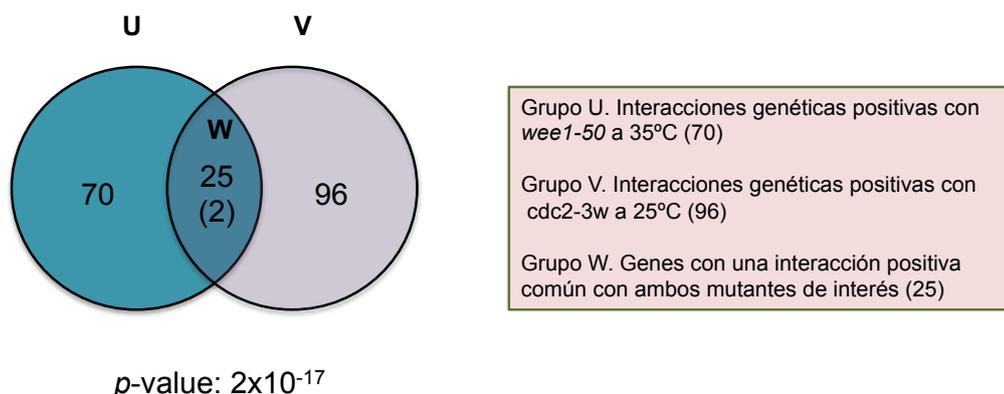
de interacción 1 y 2) y el 6% a las interacciones positivas fuertes (puntuación de interacción 3 y 4). Del mismo modo, en el caso de *cdc2-3w* las débiles representaron el 96% y las fuertes sólo el 4% (Figura 8).

Cuando se compararon las listas entre *wee1-50* y *cdc2-3w*, se observaron 25 mutantes comunes (Figura 9), de los cuales 22 mostraron una interacción positiva débil en ambos casos y de los tres restantes, dos fueron fuertes con *wee1-50* y débiles con *cdc2-3w* y uno fuerte con *cdc2-3w* y débil con *wee1-50* (Tabla 1). De acuerdo al grado solapamiento ( $p$ -valor:  $2 \times 10^{-17}$ ) y al número de interacciones por azar (2), los genes en común con interacciones positivas fueron producto de un evento estadísticamente significativo.



**Figura 8.** Estimación de la frecuencia absoluta acumulada y relativa de las interacciones positivas con *wee1-50* (A) y *cdc2-3w* (B) de acuerdo al crecimiento relativo promedio estimado. Las categorías más representadas en ambos casos corresponden a un puntaje comprendido entre 1 y 2.

En las Tablas S1 y S2 (material suplementario), se presenta la lista completa de los genes identificados, distribuidos según cada módulo de interacción (negativo y positivo) y la cepa de interés *wee1-50* 35°C y *cdc2-3w* 25°C.



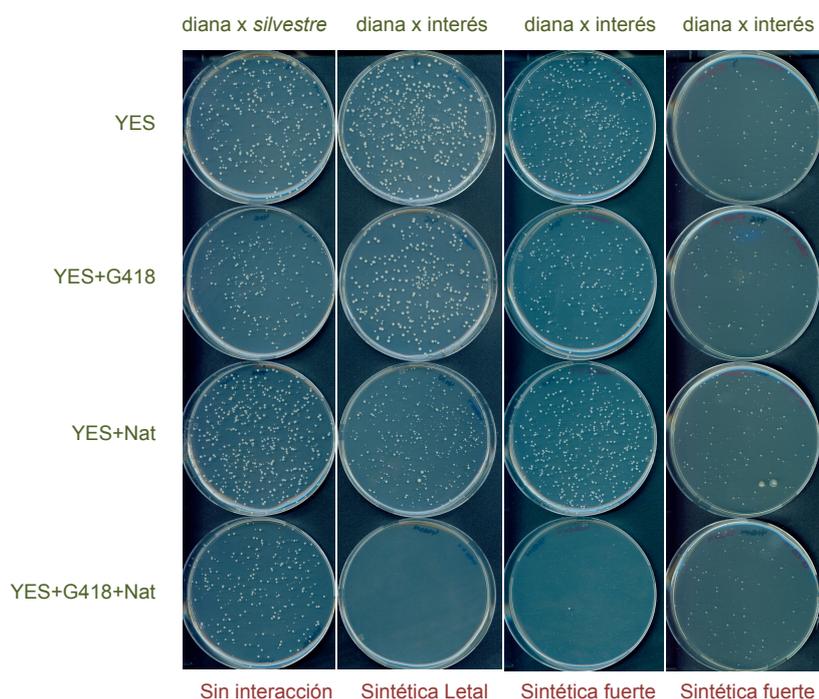
**Figura 9.** Comparación entre las listas de los genes con interacciones positivas con *wee1-50* y *cdc2-3w*, encontrados en el escrutinio masivo de sintéticos letales. El grado de solapamiento calculado como un  $p$ -valor fue de  $2 \times 10^{-17}$  y el número de interacciones en común esperadas por azar de 2.

## 2. Análisis funcional de la red de sintéticos letales con *wee1-50* y *cdc2-3w*

En esta memoria se discute el significado de las interacciones negativas observadas con *wee1-50* y *cdc2-3w*, en particular de aquellas con un valor de interacción entre -5 y -2 (232), y que son descritas aquí como interacciones fuertes en su mayoría. Por otra parte, las interacciones positivas identificadas no serán analizadas ni discutidas con posterioridad y sólo serán presentadas como un recurso de interés obtenido para nuestro grupo de investigación (Tabla S1 y S2; material suplementario).

Inicialmente, se comprobaron las interacciones observadas mediante un análisis de esporas al azar (RSA). De acuerdo a la metodología, se comparó la viabilidad de las colonias del doble mutante con la de los mutantes sencillos (diana y de interés) y a su vez con el cruce control, teniendo en cuenta el número y tamaño de las mismas. En el caso de *wee1-50* se llevó a cabo el análisis a 35°C y para *cdc2-3w* a 25°C. El cruce control fue analizado en ambos casos a 25°C. Como resultado, se clasificaron las interacciones en dos categorías: **i)** interacción sintética letal (del inglés *synthetic lethal*), donde no se observaron colonias creciendo en el medio doblemente selectivo, y **ii)** interacción sintética enferma fuerte (del inglés *synthetic sick*), donde se observó una inhibición del crecimiento de las colonias y/o un número menor respecto a los parentales (Figura 10).

## Resultados-Apartado I



**Figura 10.** Categorías cualitativas observadas en el análisis de esporas al azar (RSA) para los genes identificados con *wee1-50* y *cdc2-3w* en un rango de puntuación entre -5 y -2 con el SGA.

De los 118 mutantes identificados con *wee1-50* con una interacción entre -4 y -2, se seleccionaron 72 aleatoriamente para el análisis y se confirmaron 68 en total. Las 4 interacciones restantes no fueron confirmadas, debido a que el crecimiento de las esporas en medio selectivo con G418 fue más lento que en el resto de medios, impidiendo realizar una comparación fiable. En el caso de las interacciones con *cdc2-3w*, se seleccionaron 41 mutantes de un total de 114 con un puntuación entre -5 y -2 y se confirmaron 27. Las 14 interacciones restantes, no pudieron ser confirmadas por las mismas razones (Tabla S3; material suplementario). De los resultados anteriores, se infiere que el escrutinio masivo de sintéticos letales confirmado mediante esta metodología presenta un valor predictivo positivo cercano al 95% para *wee1-50* y al 67% para *cdc2-3w*. Respecto a las interacciones no confirmadas (6% para *wee1-50* y el 33% para *cdc2-3w*) no fueron eliminadas del análisis posterior, ya que se consideró que los resultados no fueron concluyentes.

Para el análisis de la red de interacción, inicialmente se asoció un proceso biológico manualmente a los 232 genes identificados con *wee1-50* y *cdc2-3w* (Tabla S4 y S5;





material suplementario), de acuerdo a lo descrito o inferido por homología en la base de datos Pombase (Wood *et al.*, 2012; <http://www.pombase.org/>) y en la literatura.

En la [Figura 11](#), creada con la herramienta bioinformática **Cytoscape** (Shannon *et al.*, 2003) se visualiza la red de interacción con *wee1-50* y *cdc2-3w*, en la cual la distancia entre los mutantes de interés y los diana representa el grado de interacción observada. Entre los 232 elementos representados, 114 corresponden a genes que interactúan con *cdc2-3w* y 118 con *wee1-50*. Del total, 45 muestran una interacción común para ambos. En la [Figura 12](#) se organizan dichos genes de acuerdo a su función biológica y el número de elementos que conforman las mismas.

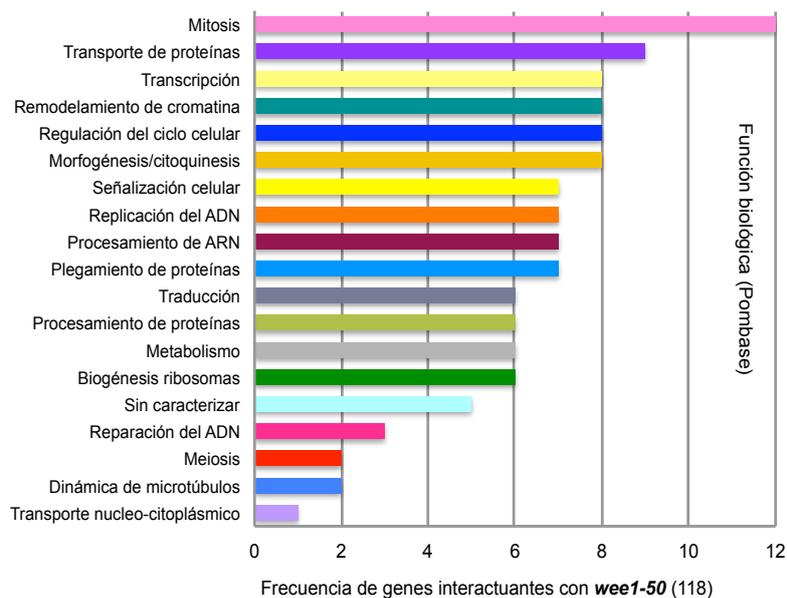
Los genes de la red de interacción con *wee1-50*, se clasificaron en 18 grupos funcionales siendo las categorías más representadas mitosis (12/118) y transporte de proteínas (9/118). Asimismo, con *cdc2-3w*, los genes se distribuyeron en 19 grupos donde las categorías de biogénesis de ribosomas (20/114) y metabolismo (14/114) fueron las más representadas. Adicionalmente, se identificaron 5 y 8 genes sin función asignada o predicha hasta ahora para *wee1-50* y *cdc2-3w* respectivamente ([Figura 13](#)).

Las interacciones comunes representaron 15 categorías, que en orden de abundancia fueron: replicación (6/45), mitosis (5/45), remodelación de cromatina (5/45), regulación del ciclo celular (3/45), señalización celular (3/45); morfogénesis/citoquinesis (3/45), procesamiento de proteínas (3/45), plegamiento de proteínas (3/45), biogénesis de ribosomas (3/45), metabolismo (3/45), transporte de proteínas (2/45), reparación del ADN (2/45), procesamiento de ARN (2/45), meiosis (1/45) y transcripción (1/45). Dado que a través del análisis anterior solo es posible destacar las funciones biológicas presentes en la red pero no el grado de representación de cada categoría con respecto al genoma, se realizó un análisis GO de cada red, empleando la herramienta **Gene list Analyser** (Wellcome Trust Sanger Institute). Dichas herramientas trabajan sobre la base de los términos GO anotados de forma extensiva para cerca del 98,3% (Aslett y Wood, 2006) del genoma de *S. pombe* por el consorcio Gene Ontology (Ashburner *et al.*, 2002; <http://www.geneontology.org>).

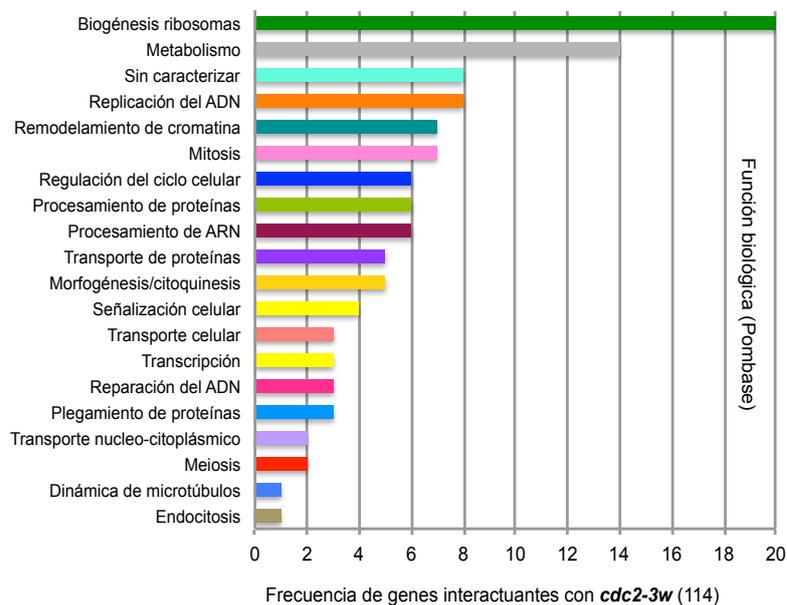
En la [Tabla 2 y 3](#) se describe, para la red de interacción con *wee1-50* y *cdc2-3w* respectivamente, el enriquecimiento significativo de los procesos, componentes y localizaciones celulares observados en el análisis con *Gene list analyser*. Para el caso de

## Resultados-Apartado I

A



B



**Figura 13.** Clasificación funcional de los genes interactuantes con *wee1-50* (A) y *cdc2-3w* (B), según anotaciones en Pombase y literatura. Se identificaron 18 y 19 categorías funcionales para la red de *wee1-*

*wee1-50*, de un total de cinco procesos sobrerrepresentados, tres mostraron un *p*-valor menor de 0,05, siendo estos ciclo celular (28/118), biogénesis y organización del citoesqueleto (17/118) y transducción de señales (23/118). Por otro lado, el análisis GO asociado a componentes celulares indicó que el cromosoma (22/118) y el centro de organización de microtúbulos (7/118) presenta sobrerrepresentación para esta red (Tabla S6; material suplementario).

**Tabla 2. Términos GO de procesos y componentes sobrerrepresentados en la red de interacción con *wee1-50*.**

Categoría GO (Proceso)	Enriquecimiento en la red	Enriquecimiento en el genoma de <i>S. pombe</i>	<i>p</i> -valor
Ciclo celular	23,73%	6,80%	$7 \times 10^{-7}$
Biogénesis y organización del citoesqueleto	14,41%	3,45%	$3 \times 10^{-5}$
Transducción de señales	19,50%	6,15%	$3,2 \times 10^{-5}$
Biogénesis y organización de organelos	20,34%	10,15%	$1,5 \times 10^{-2}$
Plegamiento de proteínas	23,73%	12,92%	$1,6 \times 10^{-2}$
Categoría GO (Componente)	Enriquecimiento en la red	Enriquecimiento en el genoma de <i>S. pombe</i>	<i>p</i> -valor
Cromosoma	18,64%	6,83%	$4,3 \times 10^{-4}$
Centro de organización de microtúbulos	5,93%	1,05%	$6,1 \times 10^{-3}$

Las celdas resaltadas destacan aquellos términos GO con un nivel de significancia menor de 0,05, corregido por el test FDR. Análisis realizado mediante la herramienta *Gene list Analyser* de Sanger ([http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/PostGenomics/S\\_pombe/GLA/GLA\\_input](http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/PostGenomics/S_pombe/GLA/GLA_input)).

Para validar estos resultados, se realizó un análisis adicional empleando el complemento **BiNGO** (del inglés *The Biological Networks Gene Ontology tool*) para Cytoscape (Maere *et al.*, 2005), a través del cual las relaciones entre los términos GO sobrerrepresentados y sus genes fueron visualizados en el contexto de la jerarquía GO. Dicho contexto, coincidió con los resultados arrojados con la herramienta **Gene list Analyser** y a su vez facilitó la interpretación de los mismos.

En la Figura 14, el tamaño de los nódulos es proporcional al número de genes presentes en cada uno y asimismo el color obedece al *p*-valor correspondiente a cada

## Resultados-Apartado I

categoría. En otras palabras, el color blanco representa aquellos nódulos con un  $p$ -valor estadísticamente no significativo, el color amarillo con un  $p$ -valor igual al fijado para el test, en este caso igual a 0,005, y el color naranja a aquellas categorías con un  $p$ -valor cinco veces mas pequeño que el anterior ( $p$ -valor igual a 0,001). La [Tabla S7 \(ver material del suplementario\)](#) presenta los valores obtenidos para cada categoría en la red de *wee1-50*. Debido a la interdependencia de las categorías funcionales, en la **jerarquía GO para *wee1-50*** se observaron diferentes procesos biológicos que fueron interpretados a la luz del otro análisis. En nuestro caso, tanto la herramienta *Gene list Analyzer* como BiNGO, coincidieron en resaltar la **sobrerrepresentación de tres ramas de la jerarquía**: i) **ciclo celular y su regulación** (ver *cell cycle regulation*), incluyendo la regulación de la división nuclear y la regulación negativa de la actividad quinasa; ii) **puntos de control de la progresión del ciclo celular** (ver *cell cycle checkpoint*) incluyendo organización del huso mitótico y control del daño del ADN durante fase S, y iii) **localización celular**, incluyendo **localización y orientación de los cromosomas y anclaje de los microtúbulos a los cromosomas**. Adicionalmente, se observó una **sobrerrepresentación particular** en la categoría **ensamblaje de la tubulina y regulación de la señalización celular**.

En relación de los términos GO asociados a componentes celulares, destacaron: i) **el complejo DASH** (codificado por los genes *spc19<sup>+</sup>*, *dad2<sup>+</sup>*, *dad5<sup>+</sup>*, *dad3<sup>+</sup>* y *ask1<sup>+</sup>*) cuya función es prevenir la estabilización de la unión microtúbulo-cinétocoro en *S. pombe* (Liu *et al.*, 2005; Sanchez-Perez *et al.*, 2005) y en *S. cerevisiae* (Cheeseman *et al.*, 2001); ii) **el complejo prefoldina** (*bob1<sup>+</sup>*, *SPAC227.10*, *SPAC3A11.1* y *SPAC227.05*) cuya función principal es dirigir el plegamiento de las proteínas en bacterias y otros eucariotas (Gong *et al.*, 2009; Ohtaki *et al.*, 2010) y iii) **el complejo Rad9/Rad1/Hus1** (en inglés *checkpoint clamp complex*), el cual dirige su actividad hacia los sitios dañados del ADN (Kaur *et al.*, 2001; Parrilla-Castellar *et al.*, 2004). En cuanto a la función molecular, el término GO más enriquecido fue **unión a tubulina** (del inglés *tubulin binding*), que hace referencia a proteínas con la capacidad de unirse y estabilizar microtúbulos según QuickGO (Binns *et al.*, 2009) tales como Alp4, Mal3, Ase1 y Mto1. De acuerdo a ambos análisis, la red de interacción con *wee1-50* no sólo involucra procesos relacionados directamente con la regulación del ciclo celular de acuerdo a lo esperado, sino que a su vez conecta con los procesos de señalización celular y procesos de dinámica de los microtúbulos, sugiriendo que ambos procesos están intercomunicados con la progresión espacio-temporal del ciclo celular.



## Resultados-Apartado I

A continuación y de forma similar, se realizó el análisis GO con *Gene list analyzer* para la red con *cdc2-3w* (Tabla 3) y con BiNGO (Figura 15). Dicho análisis arrojó un enriquecimiento muy significativo ( $p$ -valor menor que  $1 \times 10^{-5}$ ) para los procesos relacionados con ciclo celular (22/114), señalización celular (21/114) y la actividad fosfatasa (5/114). Respecto a los componentes y localizaciones celulares se encontró un enriquecimiento de genes asociados a microtúbulos (3/114) y proteínas localizados en el nucléolo (15/114) (Tabla S8, material suplementario).

**Tabla 3. Términos GO de procesos y componentes sobrerrepresentados en la red de interacción con *cdc2-3w*.**

Categoría GO (Proceso)	Enriquecimiento en la red	Enriquecimiento en el genoma de <i>S. pombe</i>	$p$ -valor
Ciclo celular	21,05%	6,86%	$4,9 \times 10^{-5}$
Señalización celular	20,18%	6,15%	$4,9 \times 10^{-5}$
Actividad fosfatasa (desfosforilación)	4,39%	0,54%	$3,2 \times 10^{-5}$
Categoría GO (Componente)	Enriquecimiento en la red	Enriquecimiento en el genoma de <i>S. pombe</i>	$p$ -valor
Microtúbulos	2,64%	0,21%	$4,38 \times 10^{-2}$
Categoría GO (Localización)	Enriquecimiento en la red	Enriquecimiento en el genoma de <i>S. pombe</i>	$p$ -valor
Nucleolo	13,16%	5,26%	$2,89 \times 10^{-2}$

Las celdas resaltadas destacan aquellos términos GO con un nivel de significancia menor de 0,05, corregido por el test FDR. Análisis realizado mediante la herramienta *Gene list Analyzer de Sanger*. ([http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/PostGenomics/S\\_pombe/GLA/GLA\\_input](http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/PostGenomics/S_pombe/GLA/GLA_input)). Los términos GO describen procesos, componentes o localización específica. En el caso de la actividad fosfatasa, el término desfosforilación entre paréntesis corresponde a un término GO parental asociado, que ha sido identificado manualmente dentro de la jerarquía (Carbon *et al.*, 2009; <http://www.geneontology.org/>).

Este análisis, resalta el enriquecimiento de la categoría relacionada con la actividad fosfatasa (Clp1, Dis2, Ppa2, Ptc2, y Ptn1), donde dicho evento ha sido relacionado en células eucariotas, con la salida de mitosis, actuando de manera antagonista a la actividad de la CDK a lo largo del ciclo mitótico (Wolf *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2012). Los procesos de ciclo celular y señalización celular también estuvieron sobrerrepresentados en el análisis de la jerarquía GO (BiNGO) para *cdc2-3w* (Tabla S9, material suplementario). De acuerdo a este último, la sobrerrepresentación se observó en las ramas de los términos GO asociados a procesos de regulación del ciclo celular,



## Resultados-Apartado I

como puntos de control que incluye el de integridad del ADN y el de ensamblaje del huso mitótico. Como resultado adicional del con BiNGO, se destaca el enriquecimiento del proceso de unión de los microtúbulos a los cinetocóros.

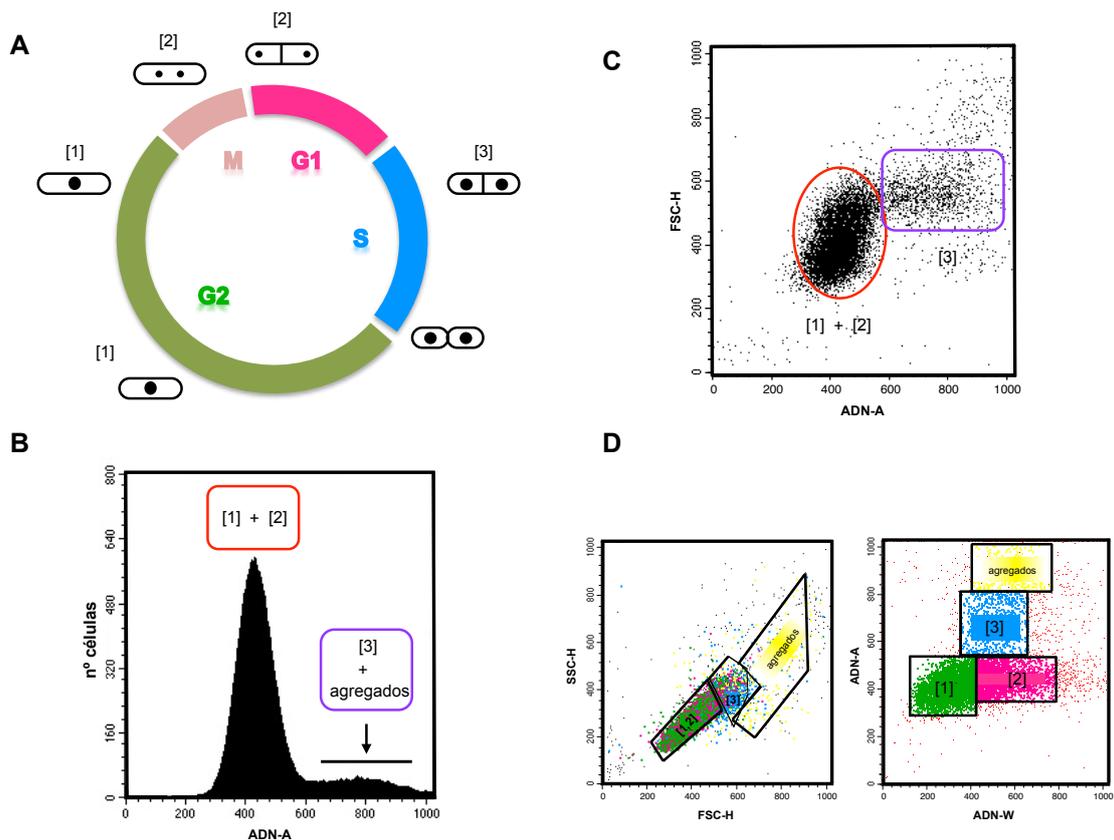
### 3. Caracterización comprensiva de los mutantes no esenciales identificados como elementos que interaccionan con *wee1-50* y *cdc2-3w*

Entre los mutantes con interacciones negativas identificados se seleccionaron 138 de la red de *wee1-50* y 49 de *cdc2-3w*, una interacción genética más fuerte (-5 y -2) y una función biológica más relevante dentro de la red. Estos mutantes sencillos se sometieron a la evaluación de: **i)** su estado morfológico mediante tinciones de la pared celular y el septo con calcoflúor y observaciones poblacionales en campo claro **ii)** su estado citológico mediante tinciones de núcleo con DAPI y **iii)** su estado de la dinámica del ciclo celular mediante un análisis por citometría utilizando yoduro de propidio. Este análisis fue realizado en medio rico (YES) y medio mínimo estándar (EMM) a 30°C a células en fase exponencial. El criterio de significancia biológica de los mutantes implicó la selección de algunos mutantes con una puntuación de interacción igual a -1. Para resumir los fenotipos mutantes obtenidos, se categorizaron manualmente los mutantes seleccionados de acuerdo a los fenotipos más observados en cada caso. Según las variaciones del aspecto morfológico encontradas, la clasificación fue: (0) células silvestres (1) células pequeñas (2) células largas, (3) células multiseptadas, (4) células curvadas, (5) formas heterogéneas, donde se observaron subpoblaciones con diferentes morfologías (p. ej. células pequeñas, largas, redondas, etc.) y (6) pérdida de polaridad.

Para el estado citológico, los fenotipos se clasificaron en: (0) silvestre, (1) núcleos fragmentados, (2) fenotipo de corte de núcleo (*cut phenotype*), (3) septación aberrante (p. ej. células con uno y/o dos núcleos al lado de uno o múltiples septos) (4) células sin núcleo, (5) núcleos descondensados, (6) septos múltiples (7) células multiseptadas, (8) células multinucleadas (p. ej. células binucleadas o células con varios núcleos sin septo) y (9) cromosomas con retraso en la segregación (*lagging chromosomes*).

Las células de *S. pombe* crecidas en YES y en EMM presentan un contenido 2C, debido a que no completan la citoquinesis hasta el inicio de la fase S (Sabatinos y Forsburg, 2009). Por lo tanto, a partir de un análisis de citometría de flujo convencional, es complejo investigar fenotipos de ciclo provocados por la ausencia de un gen. Para evitar esto, se

realizó un análisis del ciclo celular empleando la metodología descrita por Knutsen *et al.*, 2011, el cual permite distinguir entre células mononucleadas (fase G2) y binucleadas (fase G1) y a su vez explorar en detalle la progresión por el ciclo de las células. A su vez permite eliminar el efecto de agregación, a pesar del tratamiento de sonicación en la preparación de las muestras, que da lugar a problemas de pérdida de información o mala interpretación de los resultados.



**Figura 16.** Análisis de la dinámica de ciclo celular de los mutantes con interacciones genéticas con *wee1-50* y *cdc2-3w*. La figura A muestra un esquema del ciclo celular de células de *S. pombe* en crecimiento exponencial. Las figuras B y C representan citogramas que comparan nº de células y ADN-A y FSC-H y ADN-A respectivamente. La figura D representa citogramas que comparan FSC-H y SSC-H y ADN-A y ADN-W respectivamente. Los recuadros que delimitan las subpoblaciones son llamados ventanas.

En la Figura 16 se muestra un ejemplo de análisis de ciclo celular bajo esta metodología. Dicha figura muestra un citograma que compara el parámetro ADN-W vs ADN-A. En este caso, una célula binucleada se localiza hacia la derecha de la señal del ADN-W con respecto a una mononucleada y a su vez una célula con contenido 1C más baja que una 2C en la señal del ADN-A. De esta forma se distinguen 3 subpoblaciones:

## Resultados-Apartado I

1) células en fase G2 con un núcleo de contenido 2C, 2) células en G1 o mitosis tardía con dos núcleos de contenido 1C cada uno y 3) células en fase S con un contenido entre 2C y 4C. Las células agregadas son identificadas en el citograma que compara el parámetro FSC (tamaño) con SSC (complejidad) y posteriormente omitidas en el análisis mediante ventanas.

Posterior a este análisis se clasificaron los fenotipos del ciclo celular en función de su contenido y de la progresión de las fases: (0) células silvestres, dónde el citograma combina las subpoblaciones 1 y 3 (1) células con población en G1, dónde el citograma combina las subpoblaciones 1 y 2, y (2) células con una menor población de células en fase S, posiblemente debido a una citoquinesis adelantada, (3) células grandes en fase S, debido a un probable retraso en replicación y citoquinesis y (4) células grandes en fase G2, por posible retraso en la entrada a mitosis. Asimismo, se corroboró mediante este análisis los datos de tamaño observado en el análisis de morfología y citología.

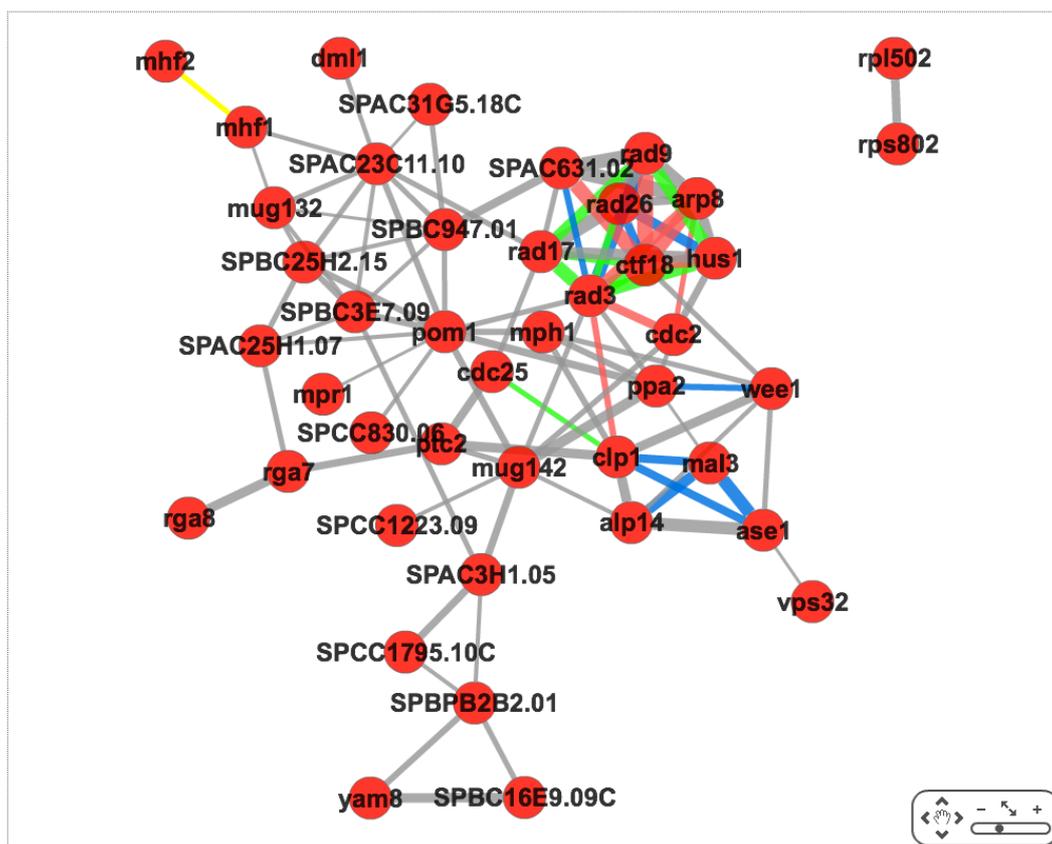
La [Tabla S10 y S11](#) (ver material suplementario), resume los resultados de las tres aproximaciones empleadas en la caracterización comprensiva de los mutantes sintéticos letales o enfermos con *wee1-50* o *cdc2-3w* respectivamente. A su vez, estos se distribuyen de acuerdo al análisis funcional descrito anteriormente.

## 4. Predicción de una red genética complementaria

Finalmente, se investigó si era posible predecir la existencia de nuevas interacciones genéticas que revelaran conexiones entre los genes identificados en común como sintéticos letales o fuertes con *wee1-50* y *cdc2-3w*. Para esto, se empleó la herramienta Plnt (del inglés *Pombe Interactome*) desarrollada por Pancaldi *et al.*, 2012, la cual predice con base en el algoritmo SVM (del inglés *Supported Vector Machine*) o RF (del inglés *Random Forest*), una posible red de interacciones entre los genes identificados, que podrían guiar la búsqueda de la relación funcional entre estos genes y la maquinaria de regulación del ciclo celular. Estos algoritmos tienen en cuenta las interacciones genéticas y físicas descritas para *S. pombe* y *S. cerevisiae* en la base de datos BioGRID hasta la fecha (Stark *et al.*, 2006). Asimismo, predicen las interacciones de acuerdo a características descritas de las proteínas, incluyendo sus propiedades físicas y químicas, la posición física en el cromosoma, los términos GO *superslim*, las condiciones de expresión y la colocalización. Los autores de esta herramienta afirman, que de acuerdo a

la relación de interacciones predichas e identificadas experimentalmente, esta herramienta tiene un valor positivo de predicción del 73%.

En consecuencia, dicha predicción imita, en cierto sentido, los resultados de un análisis genético E-MAP (del inglés *epistatic miniarray profiles*), el cual identifica interacciones positivas (p. ej. interacción proteína-proteína) y negativas, junto con el grado de severidad, observadas tras la combinación por parejas de un grupo de genes (Schuldiner *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2010). Mediante el uso de la metodología E-MAP se han identificado interactomas genéticos, que describen el equilibrio molecular y celular para el genoma de *S. pombe* (Roguev *et al.*, 2008; Ryan *et al.*, 2012) y *S. cerevisiae* (Costanzo *et al.*, 2010).



**Figura 17.** Red de interacción, predicha con la herramienta Plnt (Pancaldi *et al.*, 2012), entre los genes comunes identificados para la red con *wee1-50* y *cdc2-3w*. Las proteínas de interés son representados en la red como nódulos rojos, cuya significancia de interacción es dependiente del grosor de la línea que los une. Las predicciones son contrastadas con la base de datos BioGRID (Stark *et al.*, 2006) y presentan un *p*-valor menor de 0,05. Aquellas que han sido experimentalmente identificadas son ilustradas en verde y azul si se refieren a interacciones proteína-proteína o interacciones genéticas negativas descritas en *S. pombe*

## Resultados-Apartado I

En este caso, la predicción se realizó para los 45 genes identificados en común junto con los genes *wee1*, *cdc2* y *cdc25* para dirigir la misma hacia el sistema de regulación de entrada a mitosis. En total se identificaron 247 interacciones con un  $p$ -valor por encima de 0,05 en ambas pruebas estadísticas (Figura S1; material suplementario). El uso de ambos algoritmos tuvo como objetivo la obtención de resultados mas fiables (Tabla S11; material suplementario). La representación de la Figura 17, incluye las 100 interacciones con el nivel de significancia mas alto ( $p$ -valor SVM > 0,74 y RF > 0,54).

# Resultados

## Apartado II

## 1. Identificación del gen *ppa2*<sup>+</sup> como un regulador de ciclo en *S. pombe*

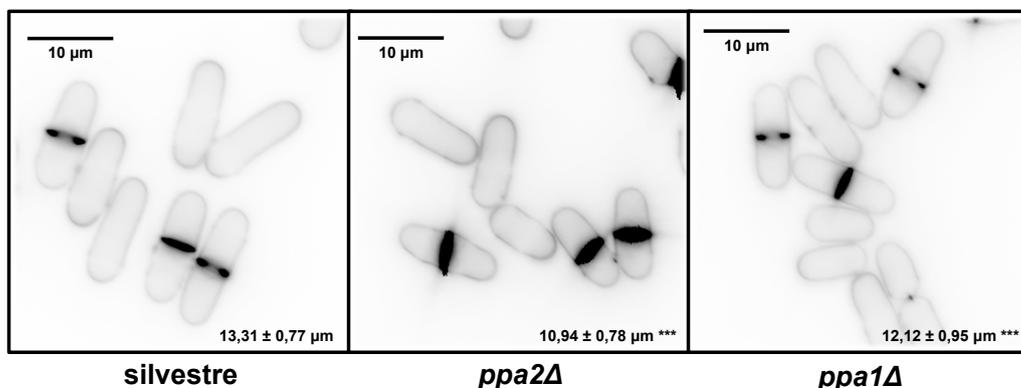
Como se ha comentado en la introducción, el ciclo celular se compone de una serie de eventos que son regulados temporalmente a través de oscilaciones en la actividad de la quinasa dependiente de ciclina (Cdk1) (Nurse, 1990). El hecho de que el ciclo celular requiera eventos moleculares dependientes de fosforilación, plantea la existencia de fosfatasas que contrarresten dichas fosforilaciones y por lo tanto que la división celular requiera una coordinación crítica entre proteínas quinasas y proteínas fosfatasas (Uhlman *et al.*, 2011; Mochida y Hunt, 2012). Aunque aún no se conoce en particular las fosfatasas encargadas de desfosforilar los sustratos de la Cdk durante el ciclo celular, Mochida *et al.*, (2009) identificaron en *Xenopus* una forma activa del complejo fosfatasa PP2A, conocida como PP2A-B55δ con un patrón de actividad inverso a la Cdk, siendo esta alta durante interfase y baja durante mitosis. Asimismo, también en *Xenopus*, se propuso que la actividad de PP2A-B55δ, es regulada por una quinasa denominada *Greatwall* (Gwl), cuya función es inactivarla a la entrada mitosis y durante ésta, para promover la fosforilación de los sustratos Cdk-ciclina B (Vigneron *et al.*, 2009, Casthilo *et al.*, 2009). Dicha inactivación, al menos a la entrada de mitosis, es llevada a cabo a través de dos potentes inhibidores de PP2A-B55δ conocidos en *Xenopus* como Ensa y Arrp-19 (Garbi-Ayachi *et al.*, 2010; Mochida *et al.*, 2010). Hasta ahora, modelos análogos de esta regulación se han propuesto en otros organismos como *Drosophila* (Wang *et al.*, 2010), humanos (Voets y Wolthuis, 2010) y *S. cerevisiae* (Juanes *et al.*, 2013), sin embargo dicho modelo aún no ha sido identificado en la levadura de fisión *S. pombe*.

### 1.1. La delección de *ppa2*<sup>+</sup> genera células mas pequeñas que la cepa silvestre

Para entender el papel de la fosfatasa tipo 2A en el ciclo celular, se examinó el fenotipo de delección de las subunidades *ppa2*<sup>+</sup> y *ppa1*<sup>+</sup> en *S. pombe*. Para ello, se reemplazó la ORF del gen *ppa2*<sup>+</sup> y *ppa1*<sup>+</sup> por el *cassette natMx6* y *kanMX6* respectivamente y se analizó el tamaño celular de ambos mutantes, tomando como referencia células en estado de septación (Mitchison, 2003). En la [Figura 1](#), se observa que tanto la delección del gen *ppa1*<sup>+</sup> como la de *ppa2*<sup>+</sup> tienen un tamaño menor que la cepa silvestre, sin embargo dicho efecto es mas acentuado en las células mutantes que carecen de *ppa2*<sup>+</sup>. Estos resultados, sugieren la que subunidad catalítica Ppa2 tiene un papel mas relevante

## Resultados-Apartado II

en el control del ciclo celular con respecto a Ppa1. Lo anterior se encuentran en la línea de lo observado por Kinoshita *et al.*, 1990 y Navarro y Nurse, 2012.

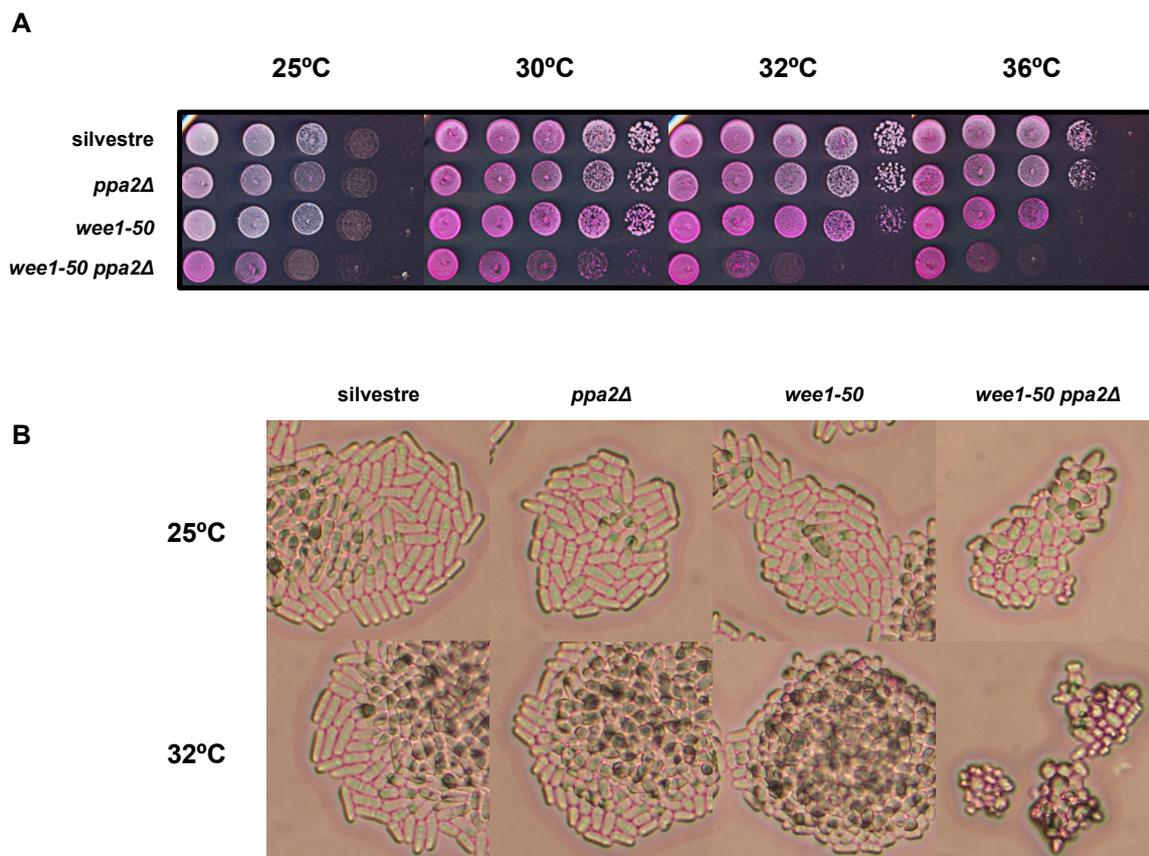


**Figura 1. Longitud celular de los mutantes *ppa2Δ* y *ppa1Δ*.** Las imágenes corresponden a células crecidas en YES a 32°C exponencialmente, que fueron teñidas *in vivo* con *blankophor*. La longitud celular es representada como la media (en μm) de 100 células septadas ± la desviación estándar. \*\*\* indica una diferencia significativa (*p*-valor < 0,001 determinado mediante el test T de *Student*) entre el mutante y la cepa silvestre.

Las células mutantes *ppa2Δ* son más pequeñas que las cepas silvestres, sugiriendo un fenotipo de ciclo asociado a una fase G2 mas corta. De acuerdo al efecto de la deleción observado en ambos mutantes, la subunidad catalítica *ppa2*<sup>+</sup> desempeña un papel mas relevante en el ciclo celular de *S. pombe* con respecto a *ppa1*<sup>+</sup>.

### 1.2 El mutante de deleción de la fosfatasa tipo 2A *ppa2Δ* es sintético letal con

Según Kinoshita *et al.*, 1990 y Navarro y Nurse, 2012, los genes *ppa1*<sup>+</sup> and *ppa2*<sup>+</sup> están implicados en el control del ciclo celular de *S. pombe*. De acuerdo a lo observado en nuestro escrutinio, los dobles mutantes *ppa2Δ wee1-50* y *ppa2Δ cdc2-3w* son sintéticos letales. No obstante, los mutantes sencillos *wee1-50* y *cdc2-3w* no están afectados en su viabilidad. Cuando el mutante termosensible *wee1-50* se crece a 35°C, se inactiva la proteína Wee1, y en consecuencia la fase G2 se acorta y las células se dividen a un tamaño menor con respecto a la cepa silvestre. En el caso de *cdc2-3w*, dicha mutación es equivalente a una hiperactivación de Cdc25, por lo que al igual que *wee1-50* las células reducen su tamaño. Para comprobar la interacción genética del gen *ppa2*<sup>+</sup> con el mutante *wee1-50* observada en el escrutinio, se realizó un ensayo de viabilidad en placa (medio YEP-agar) en un rango de temperatura entre 25°C a 36°C. Como se ilustra en la [Figura 2A](#), el doble mutante *wee1-50 ppa2Δ* presenta una



**Figura 2. Interacción genética entre *ppa2Δ* y *wee1-50*.** La delección del gen *ppa2<sup>+</sup>* en el fondo genético *wee1-50* induce pérdida de viabilidad. **(A)** Ensayo de viabilidad en placas de YEP (YES-Agar con floxina B) desde 25°C a 36°C. Las imágenes corresponden a 72 horas de crecimiento. **(B)** Microcolonias de 16 horas de crecimiento en YEP a 25°C y 32°C.

inhibición en el crecimiento a partir de 32°C en comparación con la cepa silvestre y los parentales. De igual manera, en la [Figura 2B](#) se observa que el doble mutante tiene un tamaño más pequeño que *wee1-50*, incluso a 25°C.

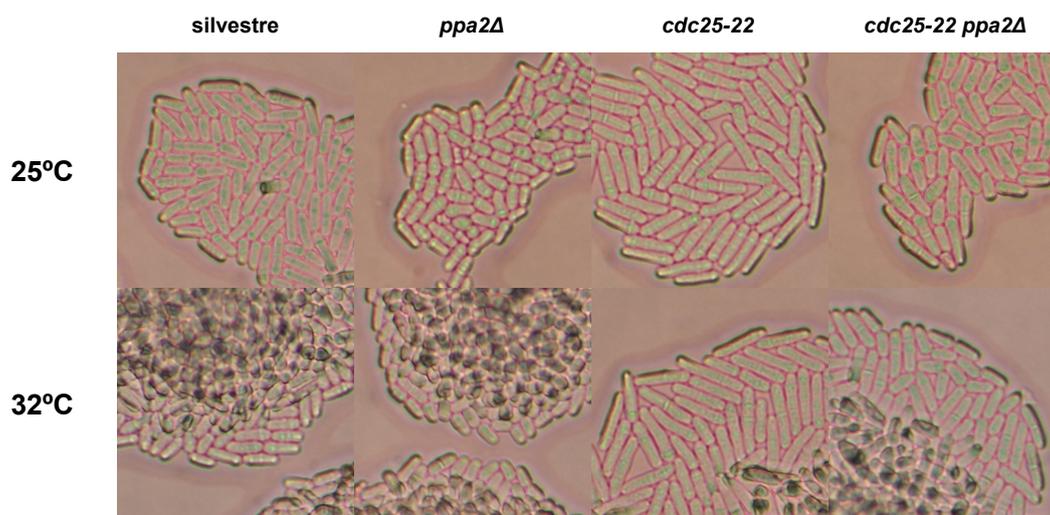
El mutante *ppa2Δ* en combinación con *wee1-50* es letal, debido a una reducción en el tamaño celular del doble mutante que genera un acortamiento inviable de la fase G2.

### 1.3. La delección de *ppa2Δ* rescata parcialmente el fenotipo del mutante

Las células de *S. pombe* que portan el alelo termosensible *cdc25-22* se bloquean al final de la fase G2 cuando se crecen a la temperatura restrictiva de 36°C. Como se ha observado, la ausencia del gen *ppa2<sup>+</sup>* genera un acortamiento en la fase G2, por lo cual se podría esperar que la pérdida de su actividad atenué los defectos del mutante *cdc25-22*. Para probar esta hipótesis, se examinó el fenotipo del doble mutante *ppa2Δ cdc25-22*

## Resultados-Apartado II

empleando la misma aproximación anterior. En dicho experimento, se observó que las células del doble mutante *ppa2Δ cdc25-22* presentan una ligera reducción en el tamaño celular en comparación con el mutante *cdc25-22* (Figura 3B), sugiriendo que la falta de actividad de la fosfatasa Ppa2 aparentemente incrementa la actividad de Cdc25.



**Figura 3. Interacción genética entre *ppa2Δ* y *cdc25-22*.** La ausencia de *ppa2*<sup>+</sup> suprime parcialmente el incremento de la longitud celular del mutante *cdc25-22*. Microcolonias de 16 horas de crecimiento en YES-Agar con floxina B a 25°C y 32°C.

El fenotipo de alargamiento del mutante termosensible *cdc25-22* es suprimido parcialmente por la delección del gen *ppa2*<sup>+</sup>, indicando una relación funcional en la actividad de estas proteínas.

A partir de los resultados expuestos en el apartado 1, se sugiere que la proteína fosfatasa PP2A podría tener un papel asociado al ciclo celular en *S.pombe* y que dicho papel estaría relacionado a una regulación negativa de la entrada a mitosis.

## 2. Identificación de dos nuevos reguladores de la entrada a mitosis en *S. pombe*

### 2.1 Identificación del homólogo funcional de Ensa y Arrp19 en *S. pombe*



**Figura 4. Alineamiento de las secuencias de los homólogos de Ensa y Arpp19 en humanos, *Xenopus* y levaduras.** El ortólogo potencial de Ensa y Arpp-19 en *S. pombe* es Igo1. El dominio endosulfina para Igo1 (Sp) es señalado en azul, para el resto de organismos en violeta

Hasta el momento se ha demostrado que el fenotipo de delección del gen *ppa2<sup>+</sup>* se asocia a alteraciones del ciclo celular. Dicho papel se encuentra en la línea de lo observado en otros eucariotas, dónde la ruta *Greatwall*-Ensa desempeña una función importante frente a la actividad de PP2A-B55δ contra fosforilaciones catalizadas por la Cdk durante mitosis (Vigneron *et al.*, 2010; Mochida *et al.*, 2009). Ensa y Arpp-19 son miembros de una familia de proteínas conservadas evolutivamente. Para identificar la proteína homóloga a éstas en *S. pombe*, se realizó una análisis de homología BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) empleando las secuencias codificantes para las versiones humanas y de *Xenopus*. A partir de este análisis, se identificó una proteína con un 38% de identidad, llamada Mug134 o Igo1 (*SPAC10F6.16*), de acuerdo al nombre establecido para sus ortólogos IGO1/IGO2 (Initiation of **G** zer**O**) en *S. cerevisiae*. Conforme a la base de datos Pombase (<http://www.pombase.org>), el producto codificado por *SPAC10F6.16* es bastante pequeño (139 aminoácidos), no es esencial y aún no ha sido caracterizado en *S. pombe*. Para evitar confusiones, en esta memoria se hará referencia a esta proteína

## Resultados-Apartado II

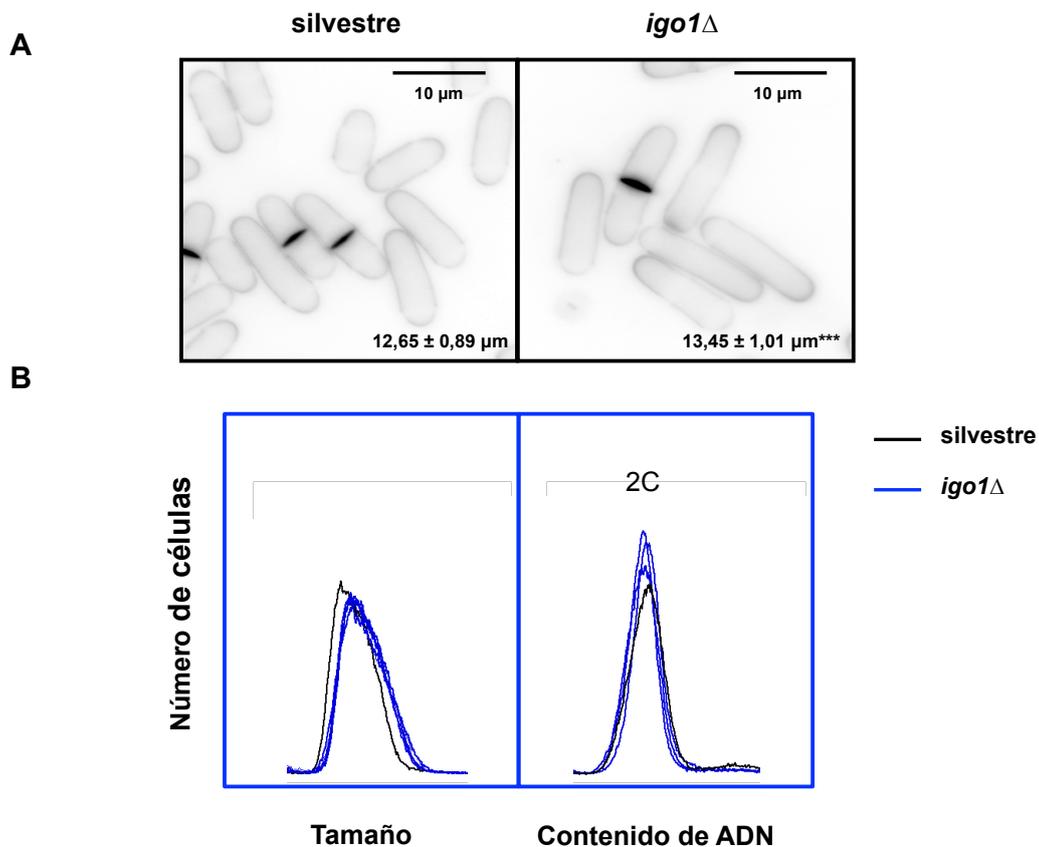
como Igo1, ya que el nombre Mug134, asignado como principal, es un error de curación de esta base. La verdadera proteína Mug134 corresponde al producto codificado por la ORF *SPAC10F6.15* (Martín-Castellanos *et al.*, 2005).

Como producto del alineamiento de las secuencias, se observa la presencia de un dominio central conservado en todas las especies analizadas, llamado dominio endosulfina (Figura 4). A su vez, dicho dominio contiene el sitio de fosforilación por *Greatwall* formado por la región consenso KYFD**S**GDY y que ha sido previamente descrito por Garbi-Ayachi *et al.*, 2010; Mochida *et al.*, 2010.

### 2.2 Las células del mutante *igo1* $\Delta$ se dividen a un tamaño celular mayor que las de la cepa silvestre

Para confirmar que el gen *igo1*<sup>+</sup> es el ortólogo funcional de Ensa y Arrp-19, se evaluó si la delección de *igo1*<sup>+</sup> podría provocar un fenotipo de ciclo que se ajustara con su función inhibitoria de la actividad del complejo PP2A-B55 $\delta$ . Recordemos que este complejo contrarresta la actividad Cdk y mantiene las células en interfase como regulador negativo de la actividad de Cdc25 y positivo de la actividad de Wee1. Con este objetivo, se crecieron células de la cepa silvestre y cinco clones de la cepa mutante *igo1::kanMX6* en YES a 25°C hasta alcanzar una D.O<sub>(595nm)</sub> entre 0,5 y 0,6. A continuación, se realizaron mediciones de la longitud celular a células septadas y se estudió su perfil de ciclo celular mediante un análisis de citometría de flujo (FACS). Como resultado, el análisis de FACS (Figura 5B) señaló un ligero incremento del tamaño celular del mutante *igo1* $\Delta$  con respecto a la cepa silvestre, que fue consistente en todos los clones analizados. De acuerdo a las mediciones en la longitud celular, la ausencia de *igo1*<sup>+</sup> incrementa el tamaño en un 10% con respecto a la cepa silvestre bajo estas condiciones (Figura 5A). En relación al contenido de ADN, no se encontraron diferencias con la cepa silvestre (Figura 5B).

La delección de *igo1*<sup>+</sup> genera un ligero incremento en la longitud celular de *S. pombe* en condiciones estándar de crecimiento. Esto apoya la hipótesis de que Igo1 actúa como un regulador positivo de la entrada a mitosis.

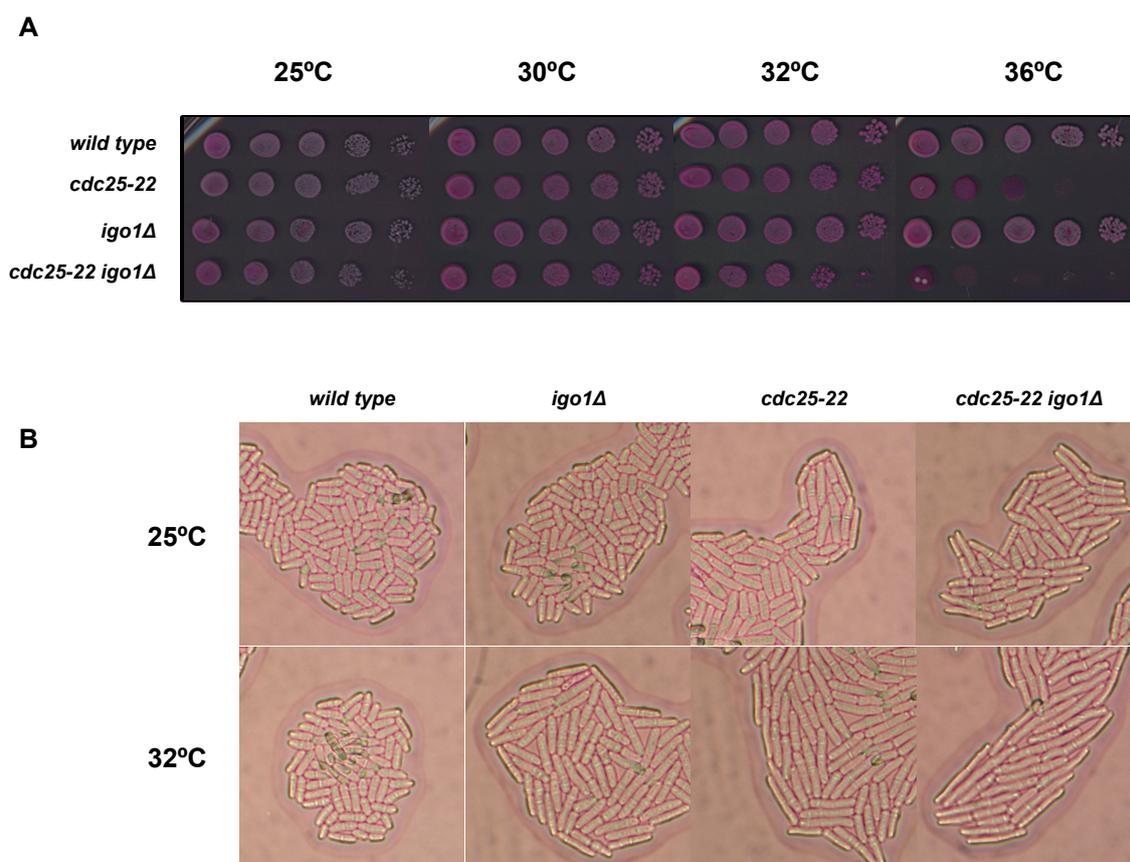


**Figura 5. Análisis fenotípico del mutante de delección *igo1*Δ.** La delección del gen *igo1*<sup>+</sup> incrementa la longitud celular de *S. pombe*. Las células crecieron hasta fase exponencial en YES a 25°C. Para las mediciones celulares, se realizó una tinción *in vivo* con *blankophor*. La longitud celular es representada como la media (en μm) de 100 células septadas ± la desviación estándar. \*\*\* indica una diferencia significativa (*p*-valor < 0,001) entre el mutante y la cepa silvestre.

### 2.3 La ausencia de *igo1*<sup>+</sup> agrava el fenotipo del mutante termosensible *cdc25-22*

Para continuar con el estudio de Igo1 como un posible regulador positivo de la entrada a mitosis, se probó si la delección de *igo1*<sup>+</sup> era capaz agravar el fenotipo de pérdida de viabilidad del mutante termosensible *cdc25-22*. Con este fin, se evaluó la viabilidad del doble mutante *cdc25-22 igo1*Δ en placas de YEP-agar incubadas a 25°C, 30°C, 32°C y 36°C en comparación con las cepas silvestre y parentales. Igualmente, se realizó un seguimiento del crecimiento de las células al microscopio después de 16 horas de crecimiento en placa.

## Resultados-Apartado II



**Figura 6. Interacción genética entre *igo1Δ* y *cdc25-22*.** La ausencia de *igo1*<sup>+</sup> agrava el fenotipo del mutante *cdc25-22*. **(A)** Ensayo de viabilidad en placas de YEP (YES-Agar con floxina B) desde 25°C a 36°C. Las imágenes corresponden a 48 horas de crecimiento. **(B)** Microcolonias de 16 horas de crecimiento en YEP a 25°C y 32°C.

**Tabla 1. Análisis epistático entre *cdc25-22* y *igo1Δ* en YES a 25°C y 30°C**

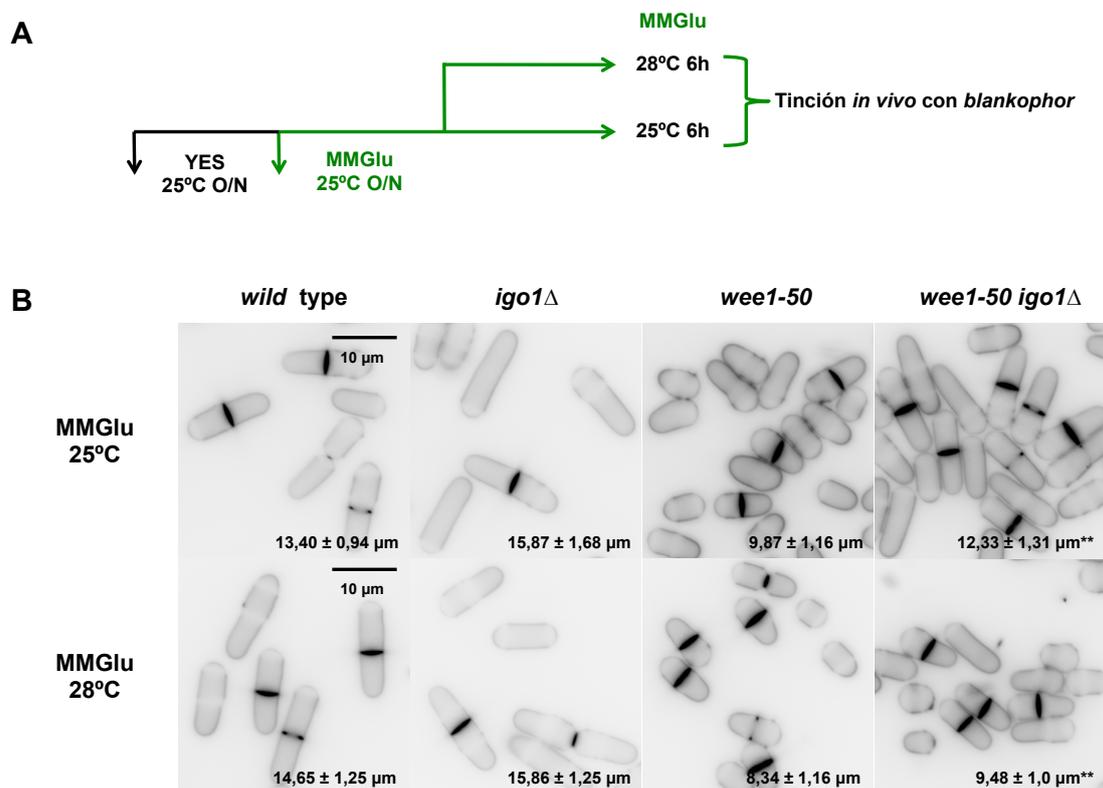
Cepa (YES)	Longitud celular (μm ± d.e)	Cepa (YES)	Longitud celular (μm ± d.e)
<i>cdc25-22</i> 25°C	21,2 ± 2,01	<i>cdc25-22</i> 30°C	24,1±3,61
<i>cdc25-22 igo1Δ</i> 25°C	21,8 ± 4,16	<i>cdc25-22 igo1Δ</i> 30°C	31,1±7,12**

La longitud celular es representada como la media (en μm) de 100 células septadas ± la desviación estándar. \*\* indica una diferencia significativa (*p*-valor < 0,01) entre el mutante *cdc25-22* y el doble con *igo1Δ*.

En la [Figura 6A](#) se observa como la ausencia de *igo1*<sup>+</sup> agrava la pérdida de viabilidad del mutante *cdc25-22* a 32° y 36°C. De acuerdo a las observaciones de células en monocapa ([Figura 6B](#)), el doble mutante *cdc25-22 igo1Δ* presenta un incremento en la longitud celular que es sólo evidente a 32°C. Para verificar si este efecto también se presenta a temperaturas inferiores de 32°C, se midió el tamaño celular en YES a 25°C y 30°C y se confirmó que el incremento se induce a partir de los 30°C ([Tabla 1](#)).

La delección de *igo1*<sup>+</sup> agudiza la pérdida de viabilidad del mutante termosensible *cdc25-22* a partir de 32°C e incrementa su longitud celular desde 30°C. Esto sugiere que *Igo1* regula positivamente a *Cdc25*.

#### 2.4 La ausencia de *Igo1* suprime la reducción de tamaño del mutante *wee1-50*



**Figura 7.** La ausencia de *igo1*<sup>+</sup> suprime la reducción del tamaño celular del mutante *wee1-50* en MMGlu a 25°C y 28°C. **(A)** Las células de la cepa silvestre y los mutantes *wee1-50*, *igo1Δ* y *wee1-50 igo1Δ* se crecieron exponencialmente en YES a 25°C, luego se transfirieron a MMGlu durante una noche y al día siguiente se dividieron en dos alícuotas, que posteriormente se incubaron en MMGlu a 25°C y 28°C durante 6 horas. **(B)** Las células se tificaron con *blankophor*. La longitud celular es representada como la media (en μm) de 100 células septadas ± la desviación estándar. \*\*\* indica una diferencia significativa entre *wee1-50* y *wee1-50 igo1Δ* (*p*-valor < 0,001 determinado mediante el test T de Student)

## Resultados-Apartado II

Cuando se transfieren células del mutante termosensible *wee1-50* desde 25°C a 36°C se produce una entrada prematura a mitosis por inactivación de la quinasa Wee1. Si Igo1 actúa como un regulador positivo, se esperaría que su ausencia rescate dicha entrada prematura. Para probar esta hipótesis, se realizó un ensayo de medición celular en MMGlu a partir de un cultivo de la cepa *wee1-50 igo1Δ* creciendo exponencialmente a 25°C y 28°C (Figura 7A). La comparación del tamaño celular se efectuó frente a la cepa silvestre y los mutantes parentales. En la Figura 7B se observa que el mutante *wee1-50* manifiesta una reducción en el tamaño celular desde 25°C y que dicha reducción es suprimida hasta niveles casi silvestres por la ausencia de *igo1*<sup>+</sup>. De igual forma se observa, que la longitud celular del mutante *igo1Δ* incrementa 2,5 μm (Figura 7B) con respecto a la longitud observada en YES 25°C (Figura 5A).

La delección de *igo1*<sup>+</sup> suprime el fenotipo del mutante *wee1-50* a 25°C y en medio restrictivo aumenta el retraso en la fase G2 de las células *igo1Δ*.

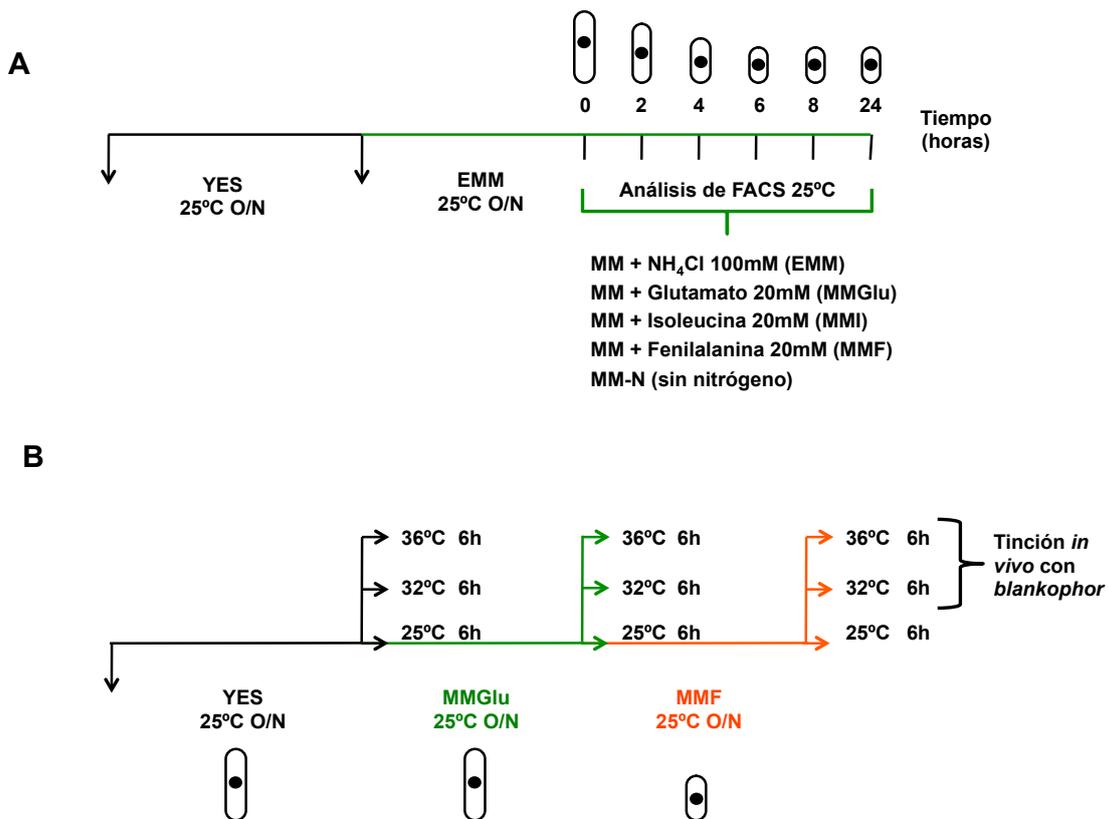
A partir de los resultados obtenidos en el apartado 2, se propone que Igo1 regula positivamente la actividad de Cdc25 y negativamente la actividad de Wee1.

### 3. La función biológica de Igo1 esta sujeta a una modulación nutricional

#### 3.1 El fenotipo de retraso en la entrada a mitosis del mutante *igo1Δ* se acentúa bajo estrés por nitrógeno

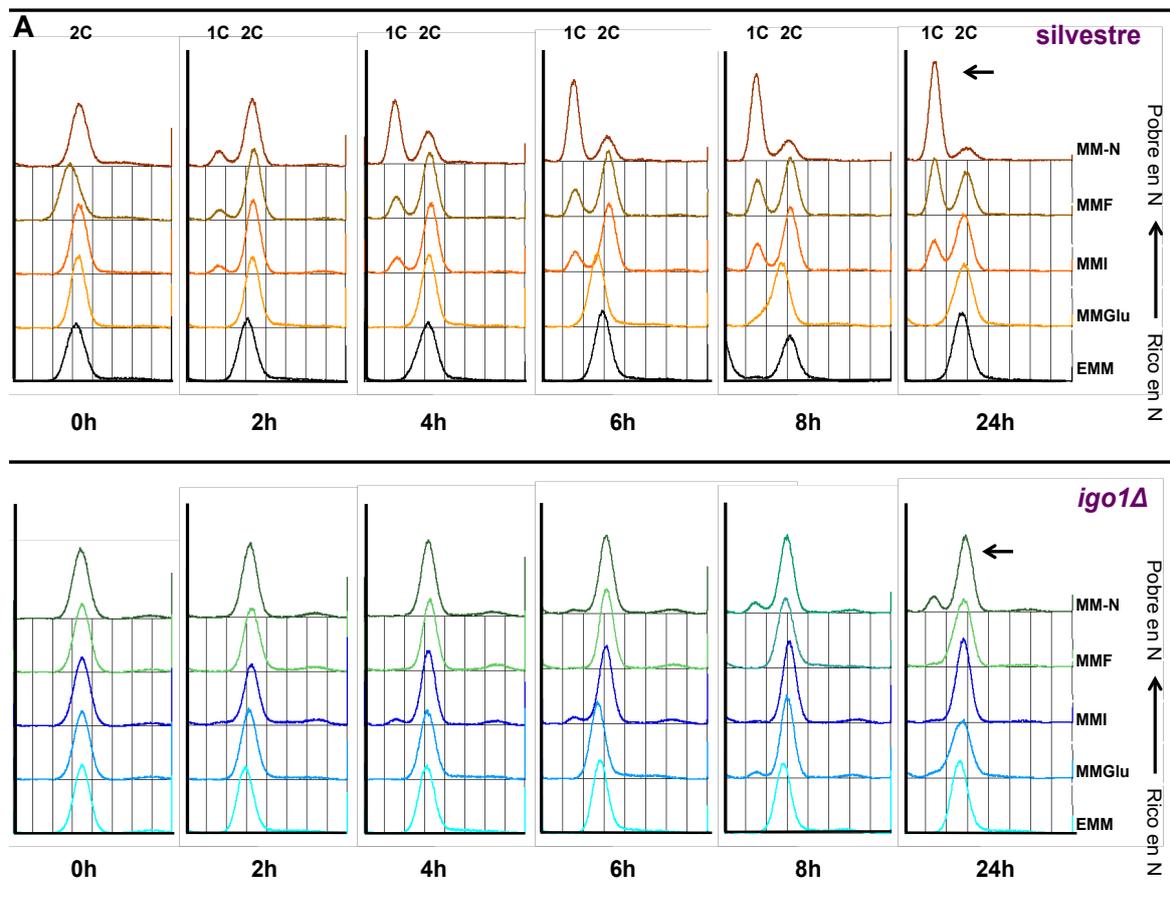
En el apartado anterior se observó que la delección de *igo1*<sup>+</sup> presenta un fenotipo contrario al de la delección de *ppa2*<sup>+</sup>, el cual se incrementa en condiciones nutricionales restrictivas. En *S. pombe*, se ha reportado que el acoplamiento entre el tamaño y la progresión del ciclo celular depende la disponibilidad de nutrientes. Cuando las células son transferidas desde un medio con una fuente de nitrógeno fácilmente asimilable a un medio mas pobre, las células avanzan hacia mitosis y proliferan a un tamaño celular reducido (Fantès y Nurse, 1977; Petersen y Nurse, 2007). De igual manera, la fase G1 se expande, como respuesta fisiológica al estrés nutricional, para favorecer la conjugación y diferenciación celular. Para investigar el efecto de un cambio nutricional sobre el ciclo celular de *S. pombe* en presencia y ausencia de *igo1*<sup>+</sup> se realizó un análisis de citometría a células creciendo en diferentes fuentes de nitrógeno o en ausencia de este. Con

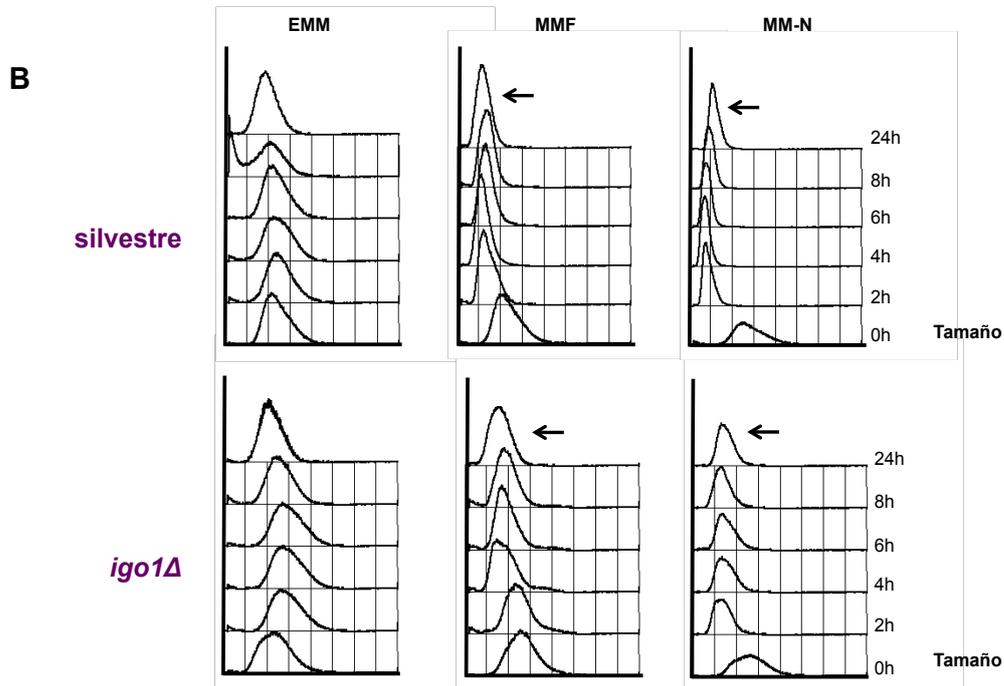
fin, inicialmente se crecieron células en YES a 25°C y se transfirieron luego a MM con amonio (EMM), dónde se mantuvieron en fase exponencial durante una noche. Al día siguiente, se transfirieron las células a medio MM con: i) amonio 100mM (EMM), ii) glutamato 20mM (MMGlu), iii) isoleucina 20 mM (MMI), iv) fenilalanina 20 MM (MMF) y v) sin fuente de nitrógeno (MM-N). (Figura 8A). Se recogieron muestras durante ocho horas, en intervalos de dos horas, y una última a las 24 horas.



**Figura 8. Metodología empleada para evaluar el fenotipo de *igo1Δ* bajo estrés nutricional (A) Análisis de FACS.** Las células de la cepa silvestre y el mutante *igo1Δ* se crecieron exponencialmente en YES 25°C, durante 24 horas. Luego se lavaron por filtración y se inocularon en EMM. A la mañana siguiente se lavaron de nuevo y se inocularon en 5 condiciones a 25°C (desde EMM hasta MM-N). Se tomaron muestras para ser analizadas por FACS, cada 2 horas, hasta 8 horas y a las siguientes 24 horas. (B). **Determinación del tamaño celular.** Las células de la cepa silvestre y el mutante *igo1Δ* se crecieron en YES a 25°C durante 24 horas. A la mañana siguiente se dividió el cultivo en tres alícuotas que se sometieron a tres condiciones experimentales (YES 25°C; YES 32°C, YES 36°C). Un cultivo adicional de YES 25°C se mantuvo como preinóculo, para ser transferido a MMGlu y MMF repitiendo el procedimiento anterior.

## Resultados-Apartado II

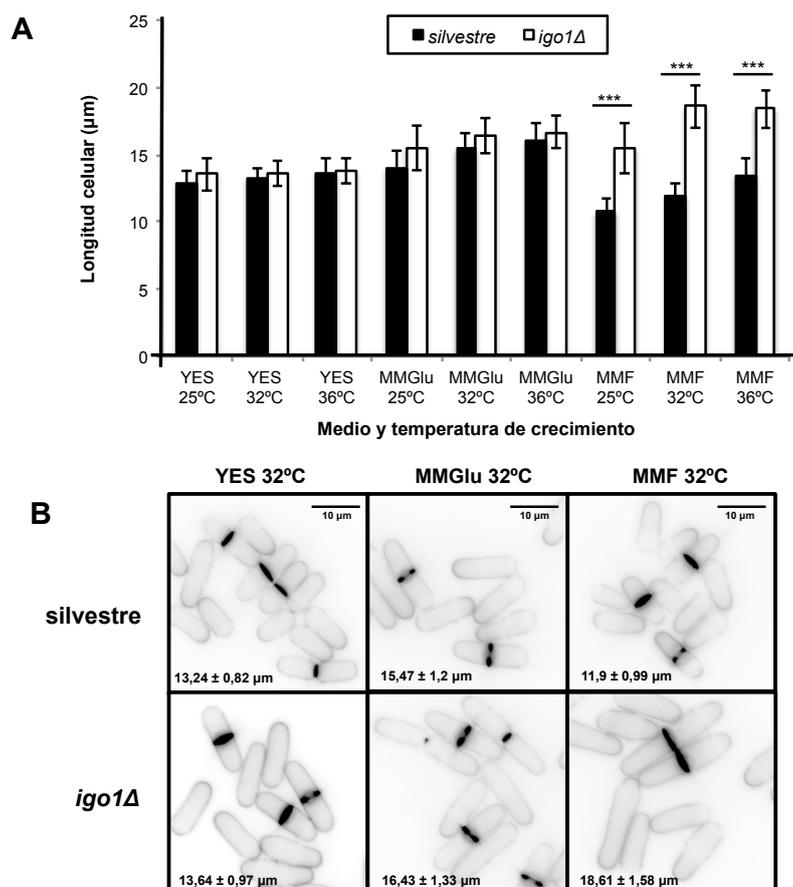




**Figura 9.** El mutante *igo1Δ* no reduce su tamaño ni acumula población celular en fase G1 bajo estrés por nitrógeno. **(A)** Análisis de la progresión del ciclo celular (contenido de ADN) durante 24 horas de la cepa silvestre y la cepa mutante *igo1Δ* desde una condición rica en nitrógeno hasta condiciones pobres y de privación de nitrógeno (EMM: amonio 100mM; MMGlu: glutamato 20mM; MMI: isoleucina 20mM; MMF: fenilalanina 20mM; MM-N: sin nitrógeno). **(B)** Análisis del tamaño celular durante 24 horas de la cepa silvestre y la cepa mutante *igo1Δ* en condiciones ricas de nitrógeno (EMM), condiciones pobres en nitrógeno (MMF) y privación de nitrógeno (MM-N).

De acuerdo a la [Figura 9A](#), la cepa silvestre acumula células en fase G1 en los medios con una fuente de nitrógeno pobre como isoleucina y fenilalanina, mientras que el mutante *igo1Δ* no responde al cambio nutricional. Del mismo modo, las células mutantes *igo1Δ* tampoco se bloquean en la fase G1 como una cepa silvestre en condiciones de ausencia de nitrógeno. En la [Figura 9B](#), se observa como las células del mutante *igo1Δ* no reducen su tamaño al igual que la cepa silvestre en MMF y MM-N. Este mismo comportamiento también es advertido en MMI (datos no mostrados). Posteriormente, con el fin de estas observaciones, se evaluó si dicho efecto se mantiene a otras temperaturas como 32°C y 36°C, empleando esta vez sólo MMF como fuente de nitrógeno pobre, ya que el comportamiento en isoleucina fue similar ([Figura 8B](#)).

## Resultados-Apartado II



**Figura 10.** El fenotipo del mutante *igo1Δ* se acentúa en MMF independientemente de la temperatura de crecimiento. **(A)** Representación de la longitudes celulares de la cepa silvestre y el mutante *igo1Δ* en YES, MMGlu y MMF a tres temperaturas 25°C, 32°C y 36°C. \*\*\* indican un *p*-valor 0,001. **(B)** Imágenes de células teñidas *in vivo* con *blankophor*, que ilustran el fenotipo de *igo1Δ* asociado a su longitud celular en los diferentes medios a 32°C.

Como se aprecia en la [Figura 10](#), las células del mutante *igo1Δ* muestran un incremento significativo en la longitud celular con respecto a la cepa silvestre en MMF. Dicho incremento muestra la misma relación en todas las temperaturas (entre 1,4 y 1,6 veces más), sugiriendo que dicho fenotipo es independiente de la temperatura de crecimiento. En relación al resto de condiciones, el incremento es menos significativo.

El fenotipo de *igo1Δ* incrementa a medida que el medio de cultivo es mas pobre en nitrógeno, sugiriendo que el gen *igo1+* es esencial para promover la entrada a mitosis bajo estrés nutricional por nitrógeno en *S. pombe*.

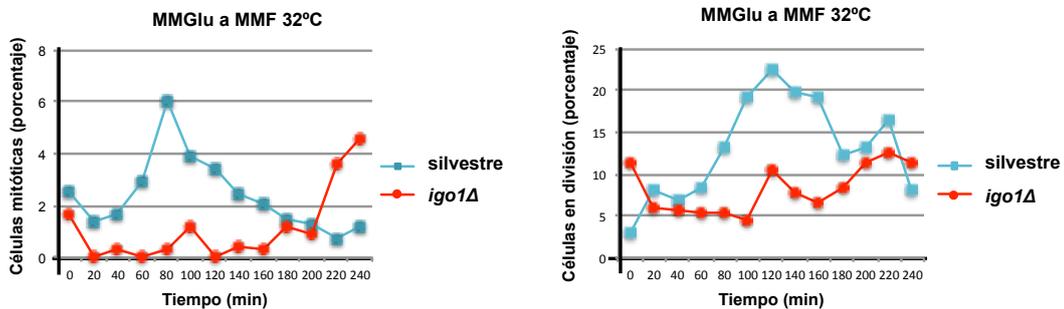
### 3.2 Igo1 induce la entrada a mitosis en *S. pombe* en respuesta a una limitación de nitrógeno

Estudios que han analizado el patrón de comportamiento en el tamaño y la división celular bajo condiciones que modulan el control nutricional en *S. pombe*, han demostrado que un cambio de una buena fuente de nitrógeno a una mas pobre, genera una entrada repentina en mitosis y una reducción del tamaño celular. En ese sentido, se quiso estudiar si Igo1 desempeña un papel en la entrada a mitosis inducida por limitación de nitrógeno. Para obtener datos al respecto, se deletó el gen *igo1*<sup>+</sup> a una cepa silvestre que portaba una fusión de la proteína fluorescente *mcherry* con la subunidad  $\alpha$ -tubulina codificada por el gen *atb2*<sup>+</sup> y una fusión de la GFP con la proteína histona H3 codificada por el gen *hht2*<sup>+</sup>. Con dicha cepa y su parental, se ejecutó un ensayo de *time-lapse* durante dos horas a 32°C, con el cual se registró el comportamiento *in vivo* de una mitosis en estas cepas y a su vez, la frecuencia relativa de células que llevaron a cabo mitosis, tras un cambio desde MMGlu a MMF a 32°C, como se describe en la [Figura 12A](#). Para acondicionar las células al experimento, después del cambio a MMF, se realizó adicionalmente, una pre-incubación de 20 minutos en agitación a la misma temperatura. Los videos de este experimento pueden encontrarse en el DVD adjunto anotados como *mcherryatb2\_hht2GFP\_wt* y *mcherryatb2\_hht2GFP\_igo1\_MMGlu a MMF 32°C*. Estos videos corresponden a imágenes tomadas en intervalos de 2 minutos durante dos horas bajo temperatura controlada (32°C). A su vez, estos son el resultado de la proyección máxima de siete planos tomados cada 0,5  $\mu$ m. El núcleo se visualiza en verde por la construcción *Hht2:GFP* y los microtúbulos en rojo por la construcción *mcherry:Atb2*. Tras este experimento, se obtuvo que un 52% de las células silvestres analizadas entraron a mitosis con respecto a un 5,4% de las células mutantes en *igo1*<sup>+</sup> (n=100), sugiriendo que *igo1*<sup>+</sup> es esencial para entrar a mitosis bajo estas condiciones.

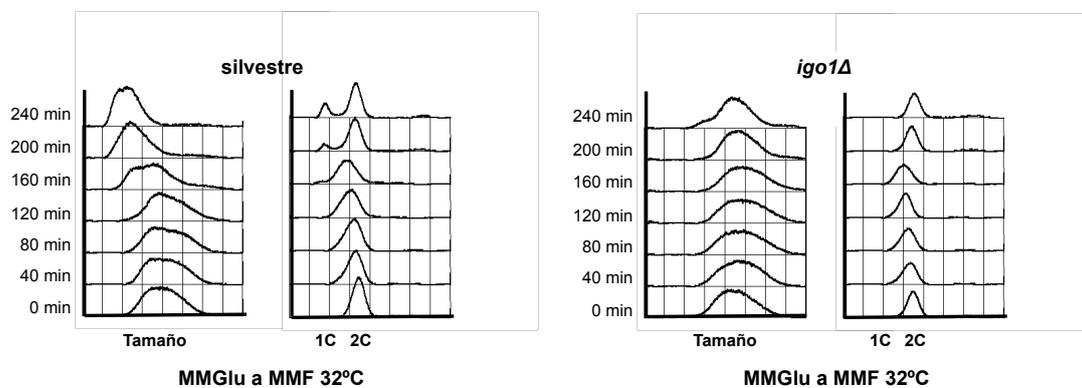
Para obtener una estadística mas precisa del porcentaje de células que entran en mitosis debido a un cambio nutricional, se empleó una aproximación mas convencional, en donde células silvestres e *igo1* $\Delta$  se transfirieron de MMGlu a MMF a 32°C, y se siguieron durante 4 horas cada 20 minutos. En cada tiempo se fijaron células y posteriormente, se tomaron fotografías de estas con los núcleos teñidos con DAPI y los septos con *blankophor*. A partir de estas imágenes, se cuantificó el porcentaje de células en mitosis y el porcentaje de células en división.

## Resultados-Apartado II

A



B



**Figura 11.** La actividad de Igo1 es necesaria en una entrada a mitosis inducida por limitación de nitrógeno. Células silvestres y del mutante *igo1Δ* se transfirieron a MMF mediante filtración desde un cultivo de MMGlu crecido exponencialmente. Las muestras para tinción con DAPI (A) y análisis de FACS (B) se fijaron cada 20 minutos durante cuatro horas a 32°C. El número de células analizadas fue  $\geq 250$ .

En la [Figura 11A](#) se observa como las células silvestres, tras el cambio de fuente de nitrógeno, manifiestan un incremento en el porcentaje de células mitóticas a los 80 minutos y otro en el porcentaje de células en división a las 120 minutos. Por el contrario, las células que carecen de *igo1*<sup>+</sup> no muestran una alteración significativa en la proporción de células que entran a mitosis, excepto entre los 200 y 240 minutos finales del experimento. Los análisis de FACS, muestran como la cepa silvestre, mas no la mutante, acumula células en fase G1 a los 160 minutos, a la vez que reduce su tamaño celular ([Figura 11B](#)) Ambos experimentos nos permiten concluir, que en un cambio desde MMGlu a MMF se induce una entrada mitosis que requiere de la actividad de Igo1.

La células de *S. pombe* requieren de Igo1 para progresar hacia mitosis en situaciones donde la calidad de la fuente de nitrógeno empeora rápidamente.

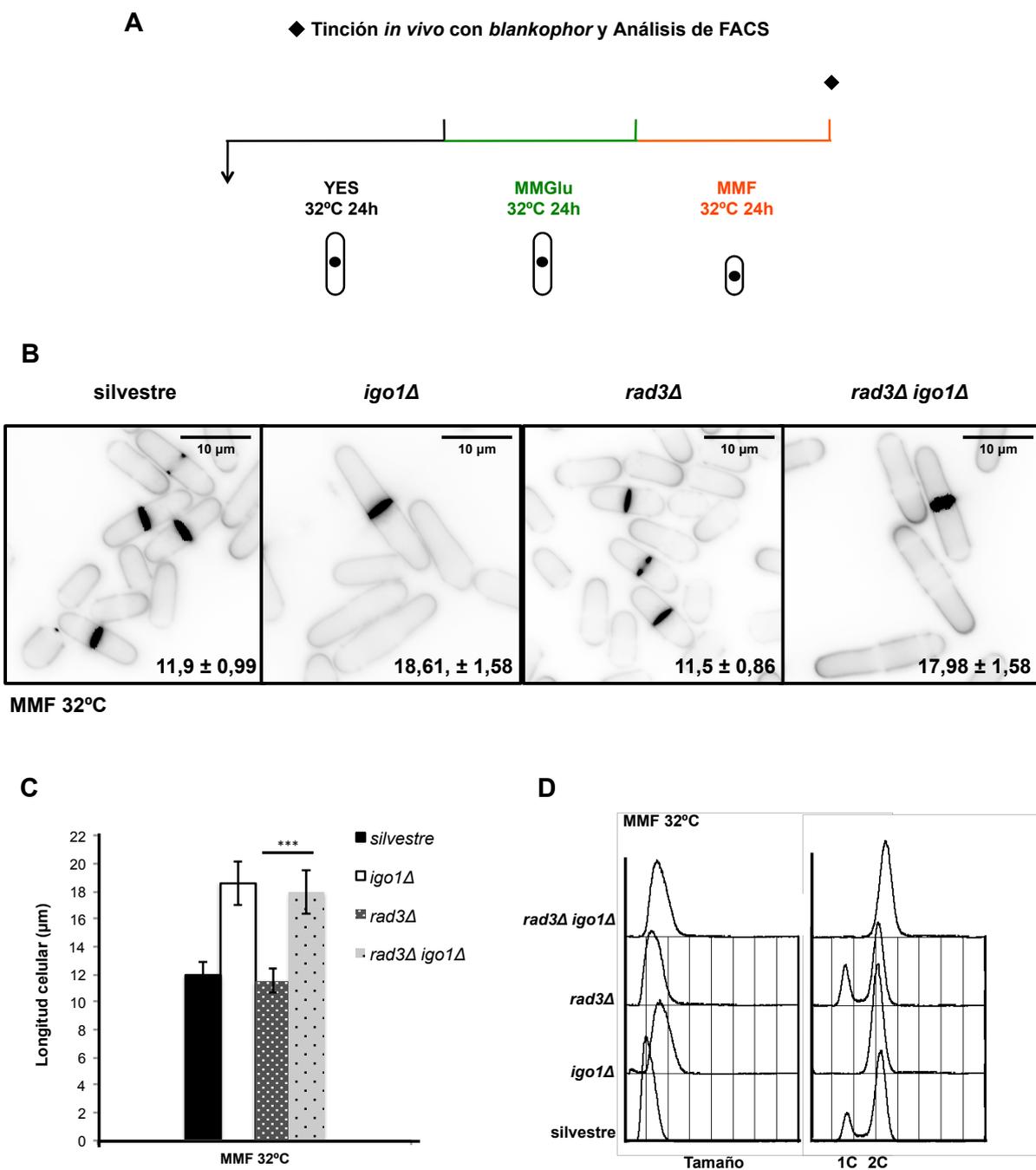
### **3.3 El retraso de entrada a mitosis en células que carecen de Igo1 no es dependiente de la actividad de Rad3 pero si de Cdc25**

Rad3, el homólogo de ATR en mamíferos, es una quinasa reguladora que es esencial en la detección de daño en el ADN y la activación del *checkpoint* que conduce a una parada del ciclo celular antes de la mitosis (Seaton *et al.*, 1992; Marthino *et al.*, 1998). En mamíferos, se ha visto que ATM, otro de los homólogos de Rad3, se activa por altas concentraciones de cloruro de sodio, posiblemente como una respuesta ante la acumulación de roturas del ADN de doble cadena (Irrazabal *et al.*, 2004). Sin embargo, en la levadura de fisión esta respuesta a estrés osmótico no ha sido demostrada. Por otro lado, análisis en la expresión génica en *S. pombe* han mostrado que Rad3 es regulado positivamente cuando las células se someten a diferentes estreses ambientales (Chen *et al.*, 2003). No obstante, Rad3 aún no ha sido relacionado a algún tipo de estrés nutricional.

Una posibilidad es que el retraso en fase G2 manifestado por las células que carecen de *igo1*<sup>+</sup>, se deba a una activación del punto de control del daño en el ADN. Para abordar esta hipótesis se construyó el doble mutante *igo1::natMX6 rad3::kanMX6* y se comparó el tamaño celular de este doble mutante con las cepas parentales y silvestre en MMF. Para llevar a cabo este análisis, se crecieron las células de acuerdo a la metodología ilustrada en la [Figura 12A](#) y se tomaron muestras para tinciones *in vivo* con *blankophor* y análisis de FACS de cultivos en fase exponencial.

En los resultados se observa ([Figura 12C y D](#)) que el mutante de delección *rad3Δ* reduce su tamaño celular de manera similar a la cepa silvestre, y su vez que acumula población en fase G1 en mayor porcentaje que la cepa silvestre, probablemente debido a un acortamiento mayor de la fase G2. El doble mutante *rad3Δ igo1Δ*, el comportamiento de *rad3Δ* se suprime por la ausencia de *igo1*<sup>+</sup>, reflejando un comportamiento fenotípico de ciclo similar al del mutante sencillo *igo1Δ*. Por otro lado, las mediciones celulares indican que el tamaño del doble mutante fue igual al mutante *igo1Δ*. ([Figura 12B y 12C](#)). Igualmente, mediante una tinción de DAPI, se analizó el estado citológico de los

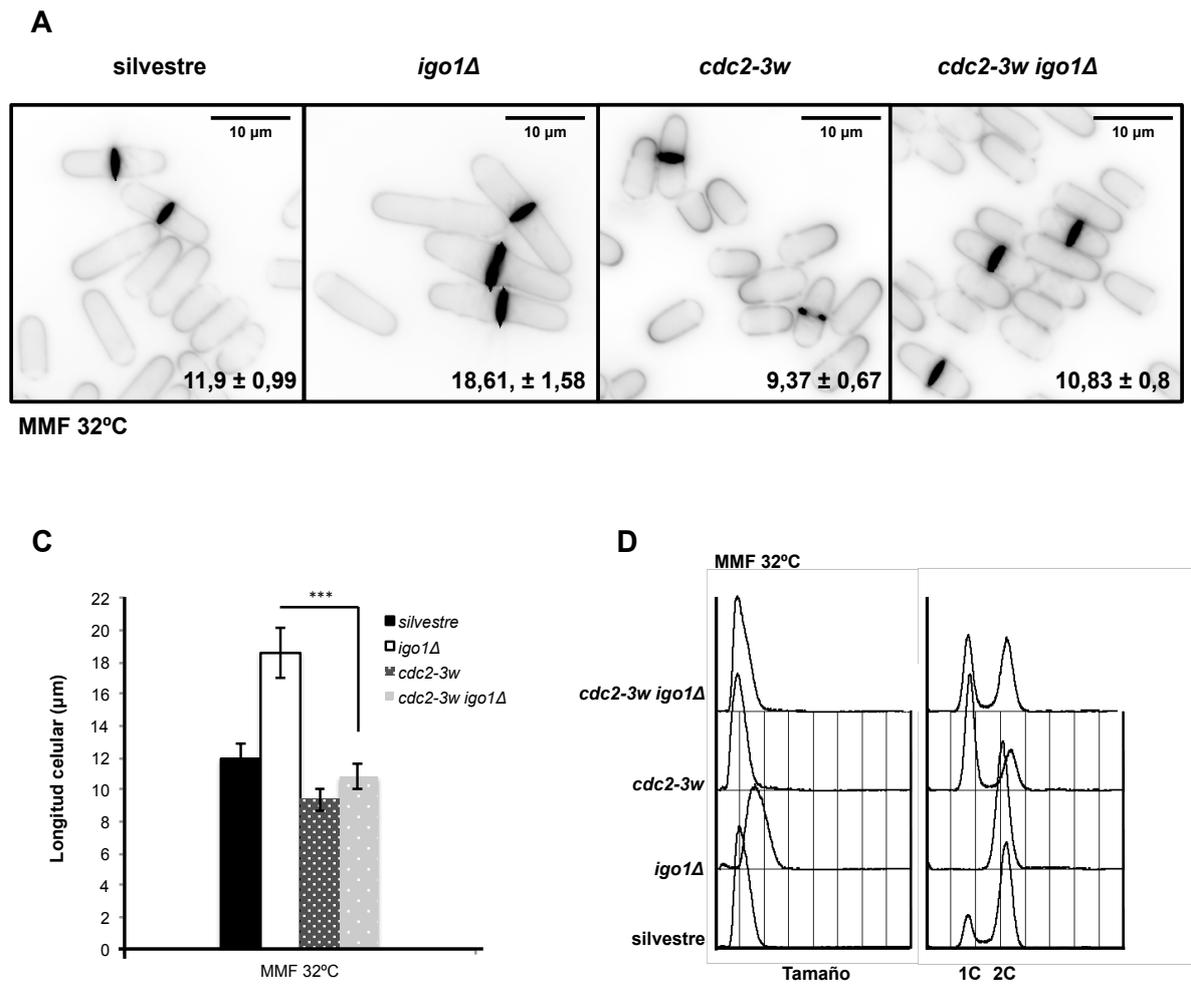
## Resultados-Apartado II



**Figura 12. Análisis epistático entre las cepas *rad3Δ* e *igo1Δ* en MMF a 32°C.** (A) Células silvestres y mutantes se crecieron en YES a 32°C en fase exponencial durante 24 horas. Luego, se transfirieron a MMGlu y se repitió el mismo procedimiento hasta crecer en MMF. Se tomaron muestras en MMF para tinción con *blankophor* y análisis de FACS. (B) Las medidas corresponden a 100 células septadas (μm) ± la desviación estándar. (C) Representación estadística de la longitud celular observada para *rad3Δ* en comparación con *rad3Δ igo1Δ*. \*\*\* indican un  $p$ -valor < 0,001. (D) Análisis de FACS de células silvestres y mutantes *igo1Δ*, *rad3Δ*, *rad3Δ igo1Δ* crecidas en MMF 32°C.

se hayan dividido tras una replicación anómala. De este experimento se concluye, que la ausencia de *rad3*<sup>+</sup> no causa ningún fenotipo sobre la progresión del ciclo celular en MMF y que la mutación dominante es la ausencia de *igo1*<sup>+</sup>.

El retraso en la entrada a mitosis bajo estrés nutricional no es dependiente de la actividad de Rad3.



**Figura 13. Análisis epistático entre las cepas *cdc2-3w* e *igo1Δ* en MMF 32°C (A)** Las medidas corresponden a 100 células septadas (μm) ± la desviación estándar. **(C)** Representación estadística de la longitud celular observada para *cdc2-3w* en comparación con *cdc2-3w igo1Δ*. \*\*\* indican un *p*-valor < 0,001. **(D)** Análisis de FACS de células silvestres y mutantes *igo1Δ*, *cdc2-3w*, *cdc2-3w igo1Δ* crecidas en MMF 32°C.

## Resultados-Apartado II

Aunque preliminarmente, ya se observó que la ausencia de Igo1 rescata la reducción de tamaño del mutante termosensible *wee1-50* a 25°C, probablemente debido a una activación parcial de Wee1, dicho experimento no descarta que esta supresión, también sea el resultado de una inactivación de Cdc25. Para resolver esta cuestión, se abordó nuevamente la idea de que Igo1 podría regular la actividad de Wee1 pero esta vez en el fondo genético *cdc2-3w*, que es insensible a variaciones en la actividad de Cdc25 pero aún sensible a la de Wee1 (Thuriaux *et al.*, 1978; Thuriaux y Nurse, 1990). Para esto, se construyó el doble mutante *cdc2-3w igo1Δ* y se creció junto con las cepas control en MMF (Ver metodología del experimento en la Figura 13A). A continuación, se determinó la longitud celular y se analizó el perfil de ciclo.

De acuerdo al análisis de FACS (Figura 13D), la cepa *cdc2-3w* acumula una mayor población de células en fase G1 con respecto al silvestre, probablemente por una entrada prematura a mitosis y consecuentemente una reducción de tamaño controlada por dos vías: **i)** limitación de nitrógeno y **ii)** imitación de la sobreexpresión de Cdc25, debido a la mutación en Cdc2 que porta el alelo condicional *cdc2-3w*. En el caso del doble mutante *cdc2-3w igo1Δ*, dicho porcentaje de células acumuladas en fase G1 es intermedio al observado entre la cepa silvestre y la cepa mutante *cdc2-3w*. En relación al tamaño celular, el doble mutante tiene un ligero incremento. Ambas observaciones pueden ser explicadas, a través de la idea de que Igo1 controla tanto la actividad de Wee1 como la de Cdc25, indirectamente a través de PP2A.

El fenotipo de retraso en la entrada a mitosis del mutante *igo1Δ* es suprimido por la mutación condicional *cdc2-3w* bajo condiciones de estrés nutricional.

## 4. Caracterización de la ruta Greatwall-ENSA en *S.pombe*

### 4.1 Identificación del ortólogo funcional de *Greatwall* en *S. pombe*

*Greatwall*, también conocida como MASTL en humanos, fue descubierta por primera vez en *Drosophila*, como una quinasa esencial para mitosis (Yu *et al.*, 2004; Bettencourt-Dias *et al.*, 2004). De acuerdo a estos estudios, los mutantes de *Greatwall* manifiestan un retraso en la condensación de los cromosomas junto con defectos de segregación cromosómica en los neuroblastos de las larvas descritos por Archambault *et al.*, en 2007.

Actualmente, existen evidencias tanto en *Xenopus* como en humanos de que *Greatwall* antagoniza la actividad de PP2A-B55δ y de su homólogo PP2A-Twins en *Drosophila* (Castilho *et al.*, 2009; Burgess *et al.*, 2010; Rangone *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). *Greatwall* pertenece a la familia AGC que son un grupo diverso de serina/treonina proteínas quinasas (Pearce *et al.*, 2010). De acuerdo al trabajo de Yu *et al.*, 2004, la quinasa *Greatwall* de *Drosophila* es bastante similar a la de humanos, mientras que un poco mas distante de sus ortólogos en levaduras RIM15 (*S.cerevisiae*) o *cek1*<sup>+</sup> de *S. pombe*. Con el fin de identificar el ortólogo funcional de *Greatwall* en *S. pombe*, realizamos una búsqueda BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) usando la secuencia de la proteína *Greatwall* de *Xenopus*, *Drosophila* y humanos. En los tres casos identificamos a las quinasas Ppk18 y Cek1, con un identidad de secuencia del 53% (E-value  $2 \times 10^{-45}$ ) y el 50% (E-value  $2 \times 10^{-44}$ ) respectivamente (Tabla 2).

**Tabla 2. Potenciales homólogos de *Greatwall* identificados por homología en su secuencia proteica mediante BLAST**

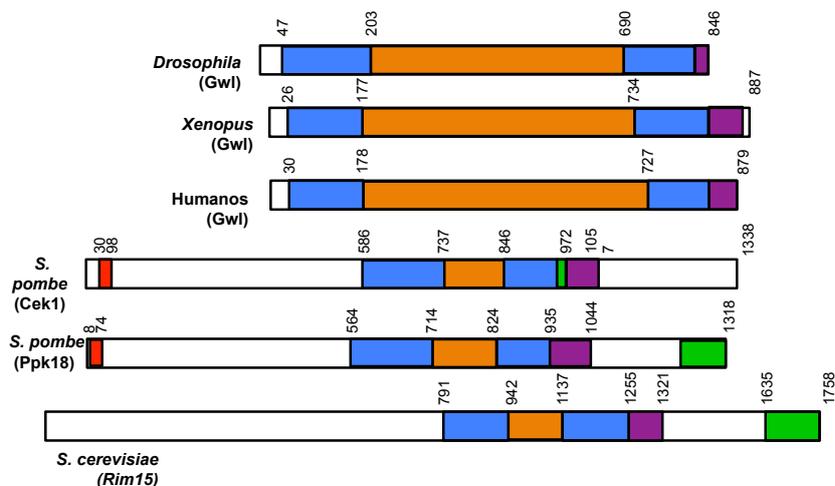
Proteína	Dominio quinasa <sup>(b)</sup>	Inserto quinasa <sup>(b)</sup>	Porcentaje Identidad <sup>(a)</sup>	E-value <sup>(a)</sup>
<b>Cek1_</b> <i>S. pombe</i>	586-737; 848-1025	111 aa	53%	$1 \times 10^{-43}$
<b>Ppk18_</b> <i>S. pombe</i>	564-714; 824-947	110 aa	50%	$2 \times 10^{-44}$
<b>Rim15_</b> <i>S.cerevisiae</i>	791-942; 1137-1282	195 aa	47%	$4 \times 10^{-42}$

(a) Análisis BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). (b) Información obtenido en la base de datos InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>). Búsquedas realizadas el día 24 de Enero de 2014.

Los productos que codifican *cek1*<sup>+</sup> y *ppk18*<sup>+</sup>, no son esenciales pero sí bastantes grandes (Cek1 con 1338 aminoácidos; Ppk18 con 1318 aminoácidos). Su dominio quinasa se encuentra separado por un inserto al igual que sus ortólogos en eucariotas superiores. A diferencia de estos, Cek1 y Ppk18 poseen un dominio *CheY-like* que actúa como un regulador de la transcripción dependiente de señales ambientales (Skerker *et al.*, 2005). Dicho dominio también está presente en Rim15, el ortólogo funcional de *Greatwall* en *S. cerevisiae* (Figura 14).

Ppk18 y Cek1 fueron identificados como los potenciales ortólogos funcionales de *Greatwall* en *S. pombe*.

## Resultados-Apartado II

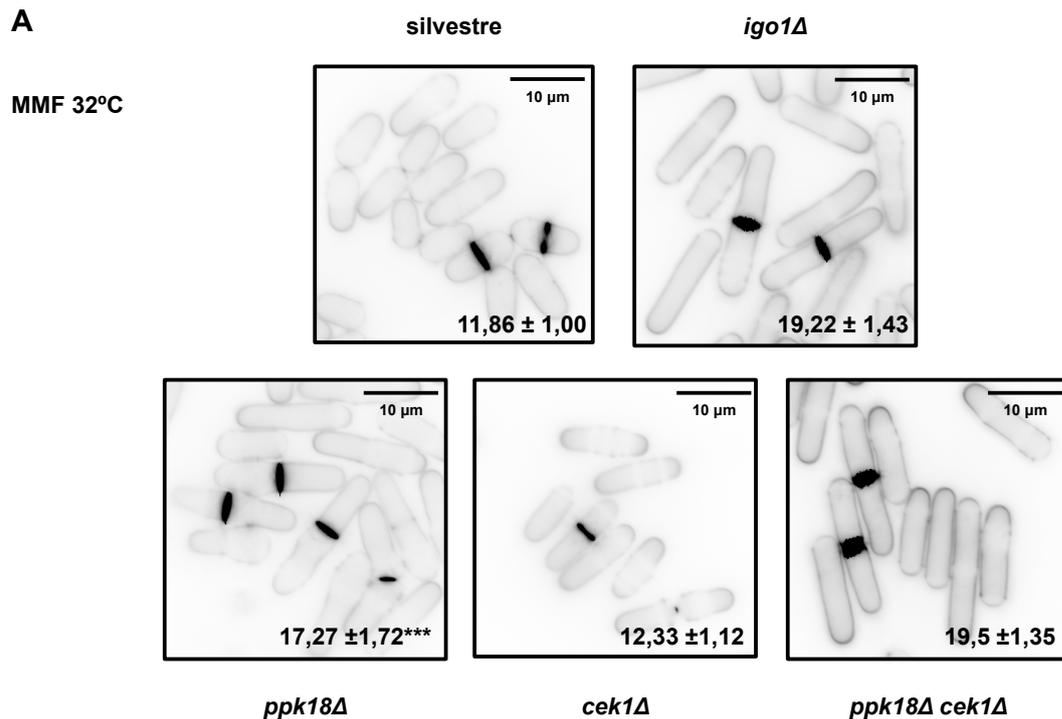


**Figura 14. Estructura de las proteínas Greatwall desde levaduras hasta eucariotas superiores.** Todas las proteínas presentan un dominio quinasa (recuadro azul) dividido en dos regiones por un inserto (recuadro naranja). Las proteínas Greatwall de *Drosophila*, *Xenopus* y humanos se encuentran más conservadas con respecto a sus homólogos en levaduras. Los potenciales ortólogos de Greatwall en *S. pombe* presentan un dominio PAS (rojo) y un dominio CheY-like (verde), implicados en transducción de señales. La estructura de las proteínas fue dibujada de acuerdo a la información obtenida en la base de datos InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>).

### 4.2 La doble delección de las quinasas Ppk18 y Cek1 reproducen el fenotipo de la ausencia de Igo1

Hasta el momento ninguna de estas quinasas han sido relacionadas con un papel en entrada a mitosis, por lo que nuestro siguiente objetivo fue evaluar esta relación.

Inicialmente, se construyó la cepa *ppk18::kanMX6* y el doble mutante *cek1::ura4+ ppk18::kanMX6 ura4D-18*. Con dichas cepas mutantes y la cepa de delección *cek1::ura4+ ura4D-18* se analizó el fenotipo de ausencia de *ppk18<sup>+</sup>* y *cek1<sup>+</sup>* bajo limitación de nitrógeno (MMF 32°C). El experimento fue realizado siguiendo la metodología representada en la Figura 12A. En este, se analizó el tamaño celular de los mutantes *ppk18Δ*, *cek1Δ* y *ppk18Δ cek1Δ* y se compararon dichos tamaños frente al mutante *igo1Δ* y la cepa silvestre. De igual forma, se analizó la progresión del ciclo celular en cada uno mediante citometría de flujo.



**Figura 15.** La delección de *ppk18*<sup>+</sup> imita el fenotipo del mutante *igo1Δ* bajo estrés por nitrógeno. **(A)** Las medidas corresponden a células septadas que crecieron de acuerdo a la metodología ilustrada en la Figura 12A. La longitud celular es representada en µm ± la desviación estándar (n=100). \*\*\* indica una diferencia significativa con *p*-valor <0,001 entre la cepa silvestre y el mutante *ppk18Δ* **(B)** Análisis de FACS de los mutantes *cek1Δ*, *ppk18Δ*, *ppk18Δ cek1Δ* en comparación con la cepa silvestre y el mutante de *igo1Δ* en MMF a 32°C.

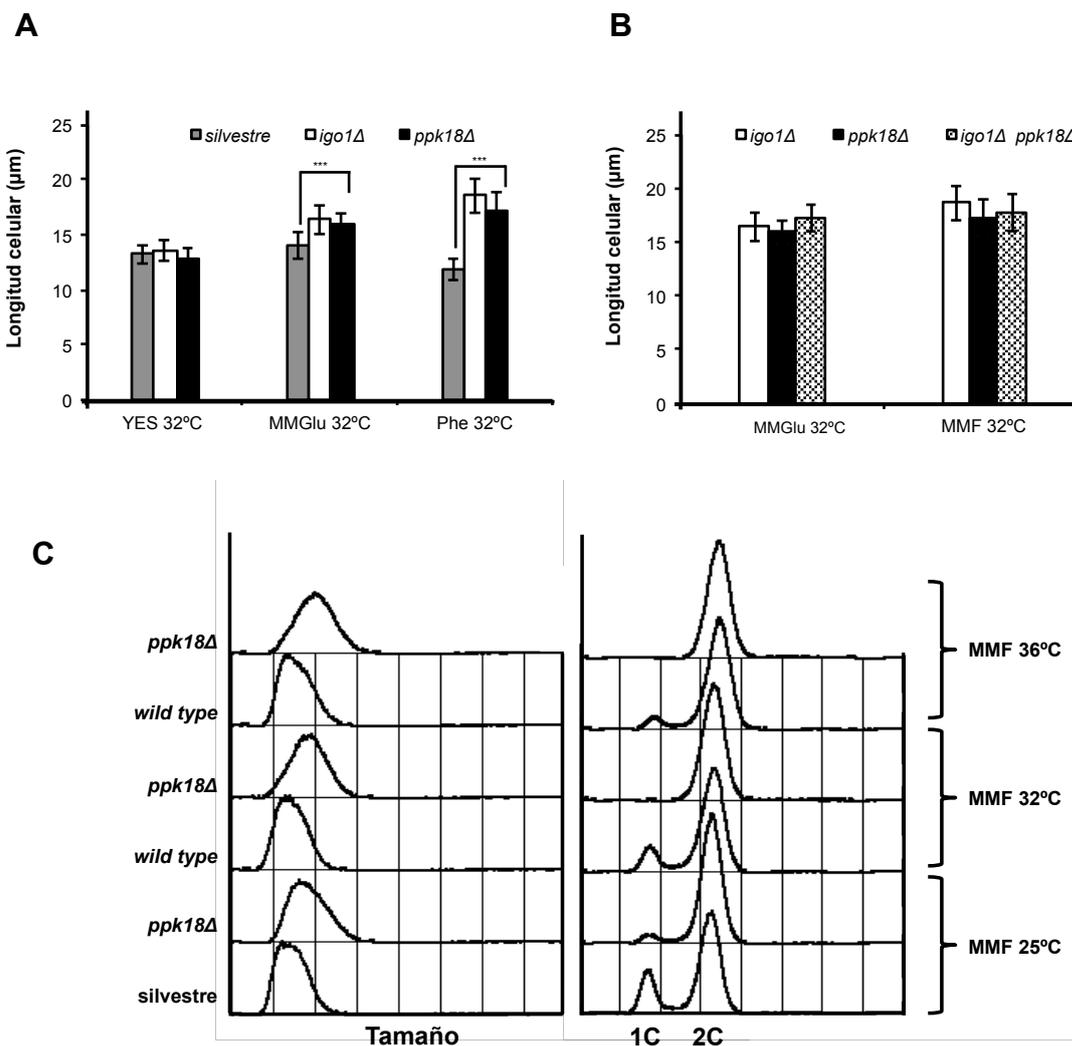
El mutante *cek1Δ* manifestó un comportamiento similar al observado por una cepa silvestre en estas condiciones, salvo por un ligero incremento en la longitud celular que no fue estadísticamente significativo (*p*-valor > 0,001) (Figura 15A). Por el contrario, la delección de *ppk18*<sup>+</sup> presentó un fenotipo casi idéntico al de la delección de *igo1*<sup>+</sup> (17,27 ± 1,72 µm frente a 19,22 ± 1,43 µm respectivamente). La diferencia observada entre el mutante *ppk18Δ* e *igo1Δ*, es suprimida al deleccionar en un mismo fondo genético a Ppk18 y Cek1 (19,5 ± 1,35 µm). Al contrastar el análisis de FACS, se observó como la cepa silvestre y el mutante *cek1Δ* acumularon una población de células en fase G1, de acuerdo a lo esperado, mientras que los mutantes *igo1Δ*, *ppk18Δ*, y *ppk18Δ cek1Δ* no (Figura 15B). Por tanto, Ppk18, pero no Cek1, parece ser la quinasa principal que acelera la entrada a mitosis bajo limitación de nitrógeno y que el papel de Cek1 podría ser interpretado como secundario, por el hecho de que el fenotipo de delección del doble

## Resultados-Apartado II

mutante *ppk18Δ cek1Δ* es equivalente al del mutante *igo1Δ*.

La delección de *cek1<sup>+</sup>* no genera ningún fenotipo asociado al ciclo celular, mientras que la delección de *ppk18<sup>+</sup>* incrementa el tamaño celular. Dicho incremento es similar al manifestado por la ausencia de *igo1<sup>+</sup>* cuando se combinan ambas mutaciones.

### 4.3 Ppk18 actúa por encima de Igo1



**Figura 16. Ppk18 actúa por encima de Igo1 controlando la entrada en mitosis bajo estrés nutricional** (A) Comparación de las longitudes celulares del mutante *igo1Δ* y *ppk18Δ* en dos medios ricos (YES, MMGlu) y un medio pobre (MMF) a 32°C. La longitud celular es representada en  $\mu\text{m} \pm$  la desviación estándar ( $n=100$ ). \*\*\* indica una diferencia significativa con  $p$ -valor  $<0,001$ . (B) Análisis epistático entre *ppk18Δ* e *igo1Δ* en MMGlu y MMF a 32°C. (C) Análisis de FACS del mutante *ppk18* en comparación con la cepa silvestre en MMF a 25°C, 32°C y 36°C.

A partir de aquí, dado que Ppk18 podría actuar en la misma vía de Igo1, se analizó la longitud del mutante *ppk18Δ* en medio rico YES, medio restrictivo MMGlu y medio pobre MMF a 32°C. Los datos obtenidos se compararon con los datos de longitud celular obtenidos para el mutante *igo1Δ* y la cepa silvestre en el experimento del apartado 3.1 (Figura 11A). Aunque las mediciones sólo se realizaron en las condiciones mencionadas para el mutante *ppk18Δ*, en paralelo se crecieron cultivos de la cepa silvestre y *ppk18Δ* para un posterior análisis de FACS en MMF a 25°C, 32°C y 36°C.

En la Figura 16A se aprecia como el comportamiento fenotípico, en términos de longitud celular, del mutante *ppk18Δ* frente a *igo1Δ* es semejante en todas las condiciones contrastadas. Por otro lado, el análisis de FACS muestra como el retraso en fase G2 del mutante *ppk18Δ* es independiente de las temperaturas de crecimiento (Figura 16C).

Para evaluar a que nivel Ppk18 actúa en la ruta de acción de Igo1, se construyó el doble mutante *ppk18Δ igo1Δ*, se midió su longitud celular y se comparó con las longitudes celulares de sus parentales (Figura 16B). En los resultados de este análisis, se observa que las células del doble mutante *ppk18Δ igo1Δ* no incrementan su tamaño celular con respecto a los mutante sencillos, indicando que el gen *igo1<sup>+</sup>* es epistático frente al gen *ppk18<sup>+</sup>*. Lo anterior, permite ubicar a ambas proteínas dentro de la misma ruta bioquímica y a su vez concluir que Ppk18 actúa por encima de Igo1.

De acuerdo a los análisis genéticos anteriores, la quinasa Ppk18 actúa por encima de Igo1, controlando la progresión hacia mitosis bajo estrés nutricional en *S. pombe*.

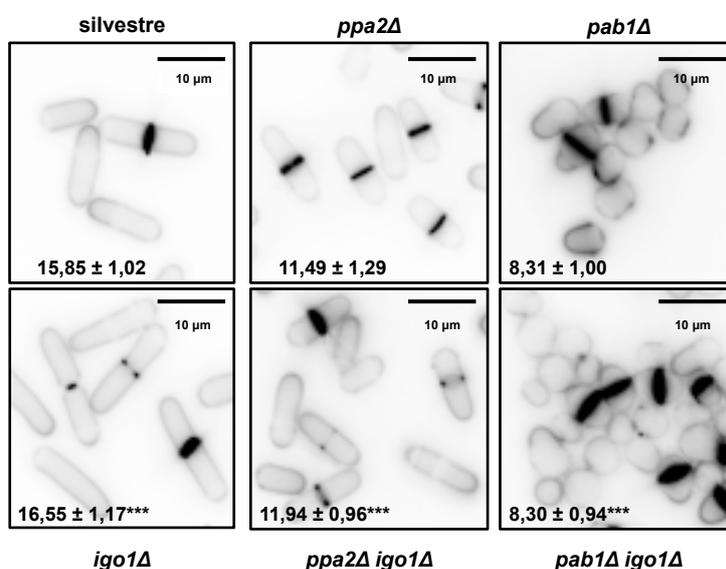
#### 4.4 El papel de Igo1 implica la inhibición de PP2A-pab1

Las fosfoproteínas PP2A son enzimas multiméricas obligadas cuya especificidad de sustrato depende de la subunidad reguladora (B) que está asociada a la subunidad catalítica (C). En *Xenopus*, la actividad de las endosulfinas (Ensa/Arrp-19) es específica para las especies de PP2A que contienen la subunidad B55, es decir que no inhiben complejos PP2A que contienen otros tipos de subunidades reguladoras como B56ε, B56γ o B"/PR48 (Mochida *et al.*, 2010). De la misma forma, en *S. cerevisiae* los ortólogos IGO1/IGO2, previamente activados por RIM15 (ortólogo de *Greatwall* en *S. cerevisiae*) se unen al complejo PP2A-Cdc55 (Bontron *et al.*, 2012; Juanes *et al.*, 2013).

## Resultados-Apartado II

Actualmente, se conoce que el gen que codifica el homólogo de la subunidad reguladora B55 en *S. pombe* es *pab1*<sup>+</sup>. Dicho gen fue aislado mediante PCR usando secuencias conservadas en la B55 humana y de *Drosophila*. Su delección genera células redondas que tienen afectada la pared celular, el citoesqueleto y la esporulación. De acuerdo a estos fenotipos y otros relacionados a Pab1, hasta ahora el complejo PP2A-pab1 regula funciones de polaridad y citoquinesis en las células de *S. pombe* (Kinoshita *et al.*, 1996; Lahoz *et al.*, 2010; Bernal *et al.*, 2012; Goyal y Simanis, 2012).

Teniendo en cuenta lo anterior, el siguiente objetivo fue evaluar si la actividad del módulo Ppk18-Igo1 inhibe la actividad del complejo PP2A-pab1 para promover la entrada a mitosis bajo estrés nutricional en *S. pombe*. Si fuera así, al eliminar tanto la subunidad reguladora Pab1 como la subunidad catalítica principal Ppa2, debería suprimir el fenotipo de delección de Igo1. Para ello, se crecieron los cultivos hasta fase exponencial en MMGlu y MMF (Figura 12A) y se compararon los fenotipos del mutante *ppa2Δ* y *pab1Δ* en combinación con *igo1Δ*.



**Figura 17.** La ausencia de *ppa2*<sup>+</sup> y *pab1*<sup>+</sup> suprime el fenotipo del mutante *igo1Δ*. Las imágenes corresponden a células en crecimiento exponencial en MMG a 32°C teñidas con *blankophor*. La longitud celular es representada en μm ± la desviación estándar (n=100). \*\*\* indica una diferencia significativa con *p*-valor <0,001.

Los resultados fueron consistentes con la idea anterior, ya que el doble mutante *igo1Δ ppa2Δ* o el doble *igo1Δ pab1Δ* suprimió el fenotipo del mutante *igo1Δ* (Figura 17). Este comportamiento también fue observado en MMF. Adicionalmente en el mismo medio, se observó lisis celular en el mutante *pab1Δ* y el doble *igo1Δ pab1Δ*, sugiriendo que la actividad de Pab1 es esencial en estas condiciones (datos no mostrados). De lo anterior, se concluye que el incremento del tamaño celular por la ausencia de Igo1 es dependiente de la actividad del complejo PP2A-pab1 en condiciones de estrés nutricional.

El fenotipo de delección de *igo1*<sup>+</sup> observado bajo estrés por nitrógeno, es suprimido por la delección del gen que codifica la subunidad catalítica *ppa2*<sup>+</sup> y del gen *pab1*<sup>+</sup> que codifica para la subunidad reguladora B55 del complejo PP2A en *S. pombe*.

A partir de los resultados obtenidos en el apartado 4, se propone que la ruta Ppk18-Igo1-PP2A-pab1 controlan la entrada a mitosis en condiciones de estrés por nitrógeno.

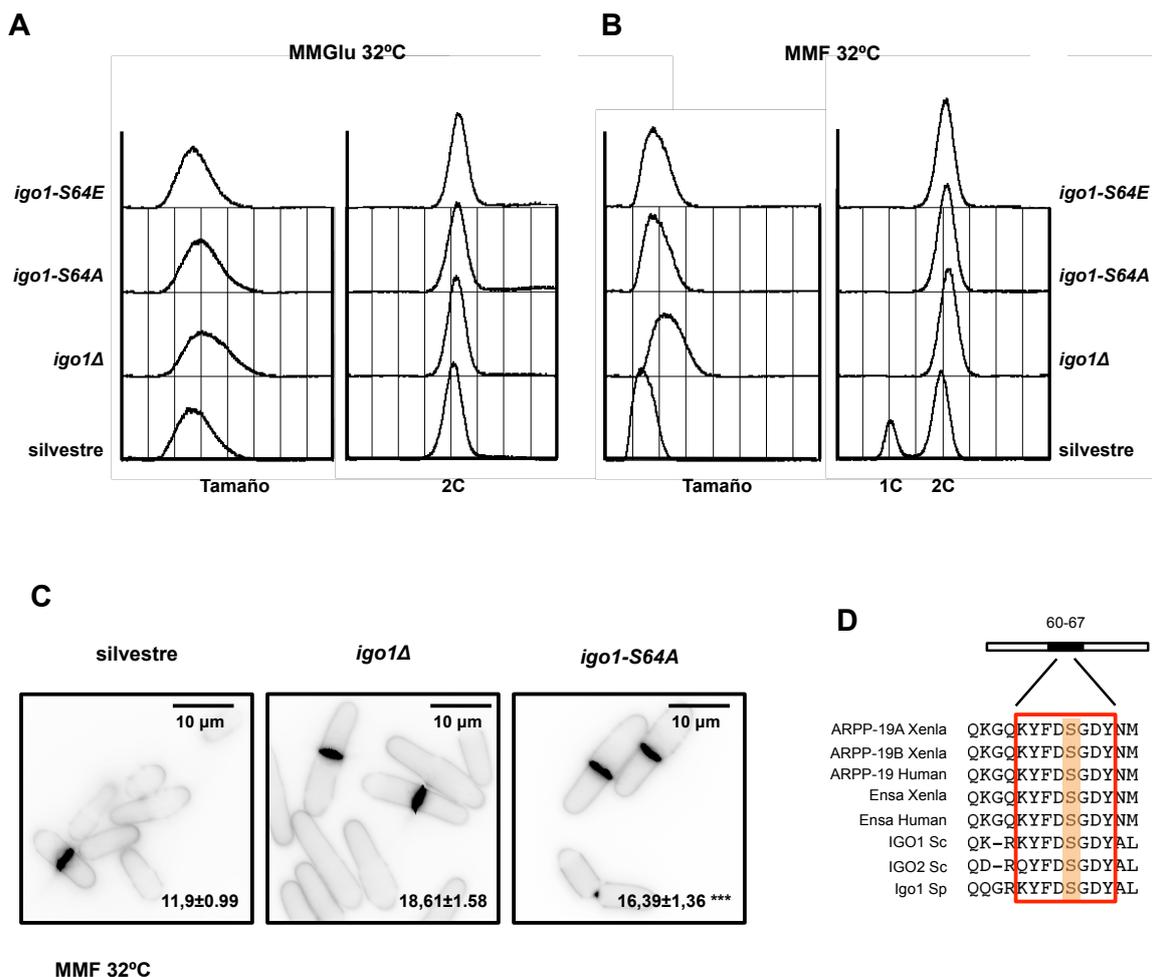
## 5. La actividad de Igo1 como respuesta a un cambio nutricional

### 5.1 La actividad de Igo1 depende del sitio de fosforilación S64 (Ser)

Las proteínas Ensa y Arpp-19 humanas son fosforiladas *in vitro* por la quinasa AGC *Greatwall* en la S67 y S62 respectivamente. En el caso de sus homólogos en *Xenopus* el sitio correspondiente es la S67. Dicha fosforilación es la responsable de promover la unión y la inhibición del complejo PP2A-B55δ en extractos de oocitos de *Xenopus* en interfase. Otros sitios de fosfo-regulación para Ensa y Arpp-19 han sido descritos: S109 por PKA y T28 y S28 por Cdk1 (Mochida *et al.*, 2010; Garbi-Ayachi *et al.*, 2010, Mochida, 2013).

De acuerdo a lo anterior, se procedió a evaluar si la actividad de Igo1 depende de la fosforilación por el ortólogo de *Greatwall* en *S. pombe* (Figura 18D). Para ello, se construyó un mutante no fosforilable (*igo1-S64A*) y a su vez un mutante fosfo-mimético (*igo1-S64E*). En una primera aproximación, se analizó el perfil de ciclo celular de ambos mutantes en MMGlu y MMF 32°C. Para ello, se tomaron muestras de cultivos crecidos hasta fase exponencial siguiendo la metodología ilustrada en la Figura 12A.

## Resultados-Apartado II



**Figura 18. La actividad de igo1 depende de la S64.** (A-B) Análisis de FACS de los mutantes *igo1-S64A* y *igo1-S64E* en comparación con la cepa silvestre y el mutante *igo1Δ* en MMGlu y MMF a 32°C. (C) Las imágenes corresponden a células silvestres y mutantes *igo1Δ* e *igo1-S64A*, crecidas exponencialmente en MMF a 32°C. La longitud celular es representada en  $\mu\text{m} \pm$  la desviación estándar ( $n=100$ ). \*\*\* indica una diferencia significativa con  $p$ -valor  $<0,001$  (D). Secuencia proteica de los homólogos de Ensa y Arpp-19 desde eucariotas superiores hasta levaduras, alrededor del sitio de fosforilación por *Greatwall* (Mochida *et al.*, 2010; Garbi-Ayachi *et al.*, 2010; Juanes *et al.*, 2013). Xenla=*Xenopus laevis*; Human=Humanos; Sc= *S. cerevisiae*; Sp= *S. pombe*.

En este experimento (Figura 19A), se observó como tanto el mutante *igo1-S64A* como *igo1-S64E* exhibieron un perfil de ciclo similar al del mutante de *igo1Δ*. Ambos comportamientos fueron interpretados como una pérdida de funcionalidad de Igo1. En el caso del mutante *igo1-S64A*, dicho fenotipo era el esperado, sin embargo en el caso de *igo1-S64E* se esperaba obtener un fenotipo de hiperactividad de Igo1, que indujera una entrada prematura a mitosis, lo cual no pudo ser confirmado. De aquí en adelante solo se analizó el mutante *igo1-S64A*.

En una segunda aproximación, se midieron las células del mutante *igo1-S64A* en condiciones de estrés nutricional (MMF, [Figura 13A](#)) y se comparó con el tamaño del mutante de delección *igo1Δ* y la cepa silvestre ([Figura 19B](#)). Como resultado, el mutante *igo1-S64A* manifestó un incremento en la longitud celular aunque no en la misma medida que la ausencia de *igo1*<sup>+</sup>, indicando que dicho sitio es necesario para la actividad de Igo1. Por otro lado, también se mutó a Ala (A) el sitio equivalente de fosforilación por Cdk1 en Igo1 (S31) y un posible sitio de fosforilación por CDK, no conservado en otros organismos, hacia el C-terminal de la proteína (S102). Individualmente, no se observó ningún fenotipo asociado al ciclo celular en los mutantes analizados (*igo1-S31A* y *igo1-S102A*) (datos no mostrados).

[La Serina 64 es importante para la actividad de la proteína Igo1 en \*S. pombe\*.](#)

### 5.2 El estado de fosforilación de Igo1 depende de un cambio nutricional

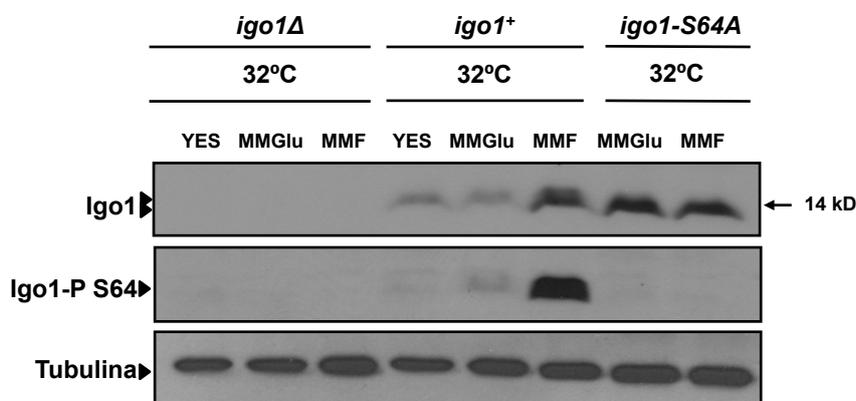
El siguiente objetivo de este trabajo se centró en el estudio de la regulación de Igo1 bajo estrés nutricional. Para ello, se generaron dos anticuerpos policlonales, uno contra la región carboxilo terminal (CGASSRRESVTRHDLE) y otro contra el péptido fosforilado en la S64 (CGRKYFD<sup>Sp</sup>GDYALNK) de la proteína Igo1 ([Ver sección 10.1 de Materiales y Métodos](#)).

En una primera aproximación al estudio de la regulación de Igo1, se analizaron los niveles de la proteína en células silvestres que crecieron inicialmente en condiciones ricas en nitrógeno como YES y MMGlu y luego en condiciones pobres de nitrógeno como MMF a 32°C. Como controles negativos se emplearon células que carecen del gen *igo1*<sup>+</sup> y células que portan el alelo fosfo-nulo *igo1-S64A*.

El primero de los anticuerpos, llamado anti-Igo1, inmunodetecta en *Western Blot* una proteína de un peso molecular similar al teórico (14 KDa) que está ausente en los extractos que carecen del gen *igo1*<sup>+</sup>. El anticuerpo anti-Igo1-P S64 detecta específicamente la fosforilación de este residuo que esta ausente en los extractos del mutante no fosforilable *igo1-S64A* ([Figura 19](#)). En los extractos silvestres de células que crecieron en MMF, incrementaron los niveles de la proteína al igual que la fosforilación específica de la S64. Estos resultados sugieren que Igo1 es una fosfoproteína, cuyo estado de fosforilación depende de la calidad de la fuente de nitrógeno en la que crecen

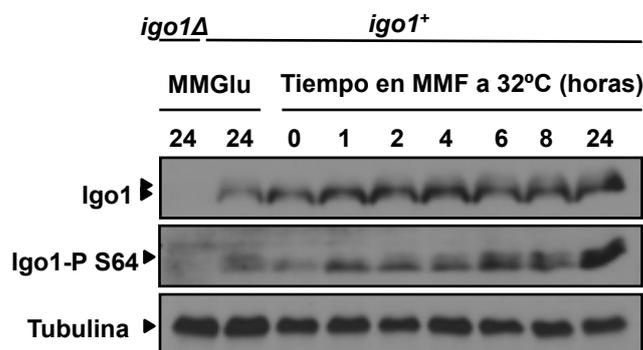
## Resultados-Apartado II

las células de *S. pombe*.



**Figura 19. Los niveles y la fosforilación de Igo1 depende de una señalización nutricional.** Se determinó el nivel de Igo1 y de su fosforilación en distintos medios. Los extractos corresponden a células crecidas en medio rico (YES), medio mínimo con glutamato (MMGlu) y medio mínimo con fenilalanina (MMF) a 32°C. En cada medio las células crecieron en fase exponencial durante 24 horas (Ver metodología en la Figura 12A). Se emplearon como extractos control, células de los mutantes *igo1Δ* e *igo1-S64A* crecidos en MMGlu y MMF a 32°C.

**Figura 20. Los niveles y la fosforilación de Igo1 depende de una señalización nutricional.** Se determinó el nivel de Igo1 y de su fosforilación en distintos medios. Los extractos corresponden a células crecidas en medio rico (YES), medio mínimo con glutamato (MMGlu) y medio mínimo con fenilalanina (MMF) a 32°C. En cada medio las células crecieron en fase exponencial durante 24 horas (Ver metodología en la Figura 12A). Se emplearon como extractos control, células de los mutantes *igo1Δ* e *igo1-S64A* crecidos en MMGlu y MMF a 32°C.



**Figura 20. Los niveles y la fosforilación de Igo1 se inducen rápidamente bajo un cambio nutricional.** Los extractos corresponden a células silvestres que se transfirieron mediante filtración, desde un cultivo crecido exponencialmente en MMGlu a MMF. Se empleó como extracto control, células de la cepa mutante *igo1Δ* crecidas en MMG a 32°C (24 horas en fase exponencial).

En la [Figura 20](#) se observa como los niveles y la fosforilación en la S64 de Igo1 incrementan una hora después del cambio nutricional. A partir de ese punto, los niveles de Igo1 permanecen constantes y la fosforilación se acumula progresivamente hasta la 24 horas en MMF. Esta fosforilación es equivalente en tiempo, a la observada en el experimento de la [Figura 19](#).

Los niveles de Igo1 y la fosforilación de la S64 se inducen rápidamente bajo un cambio nutricional. Dicha fosforilación se mantiene mientras las células continúen experimentando limitación en la fuente de nitrógeno.

### 5.3 La fosforilación de Igo1 en la S64 depende de Ppk18

De acuerdo a lo demostrado hasta ahora, la proteína Igo1 se activa por fosforilación en condiciones de estrés por nitrógeno. Con el fin de evaluar si dicha fosforilación es dependiente de la actividad de Ppk18, se examinaron extractos proteicos de células silvestres y células mutantes que carecían de los genes *ppk18*<sup>+</sup> y *cek1*<sup>+</sup> en condiciones de estrés por nitrógeno (MMF), frente a la situación sin estrés (YES). La metodología empleada se ilustra en la [Figura 21A](#).

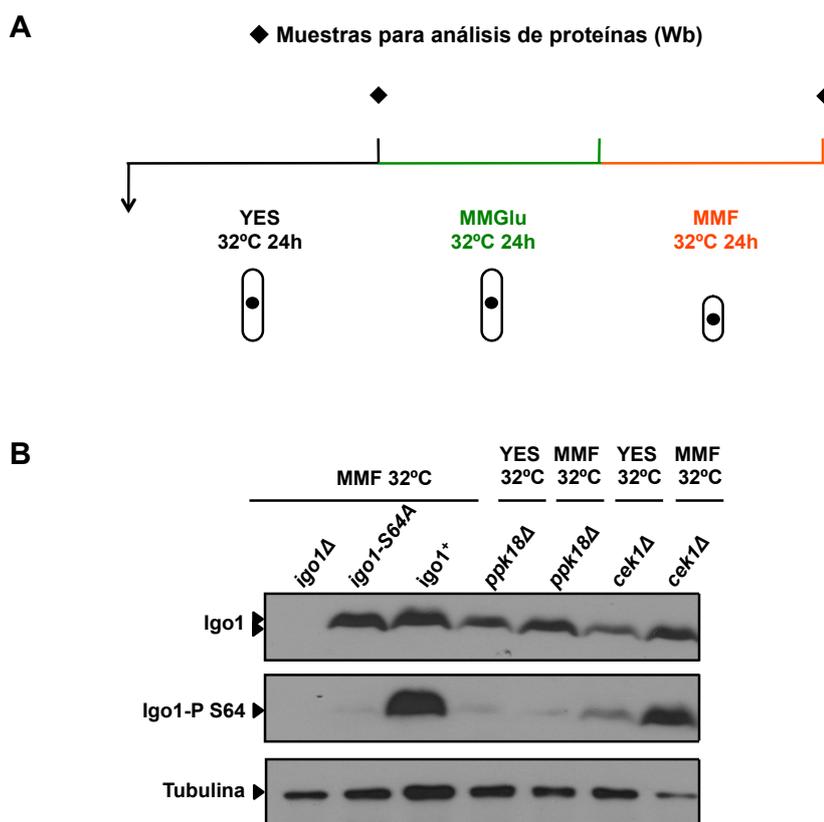
En la [Figura 21B](#), se observa que la fosforilación de Igo1 esta ausente en los mutantes que carecen del gen *ppk18*<sup>+</sup> pero no *cek1*<sup>+</sup>, sugiriendo que la fosforilación de Igo1 es solo dependiente de la quinasa Ppk18.

La fosforilación de Igo1 en el residuo Ser64 es dependiente de la actividad de la quinasa Ppk18 pero no de la quinasa Cek1.

### 5.4 La sobreexpresión de Ppk18 induce entrada a mitosis y un cese en el crecimiento a través de Igo1

Para investigar si la sobreexpresión de Ppk18 podría la entrada a mitosis, se empleó el promotor inducible del gen *nmt1*<sup>+</sup>. Existen tres versiones de este promotor, nombradas en orden descendiente según la capacidad de inducción de la transcripción *nmt1*, *nmt41*, *nmt81* (Maundrell, 1990). En este experimento, se integró la construcción *nmt1* (*kanMx6:nmt1:3HA*) en el locus del gen *ppk18*<sup>+</sup> mediante transformación. Una vez integrado el promotor, se delecionó el gen *igo1*<sup>+</sup> mediante un cruce genético.

## Resultados-Apartado II



**Figura 21. La fosforilación de Igo1 en la S64 es dependiente de la actividad de la quinasa Ppk18. (A)** Metodología empleada para obtener los extractos proteicos del *western blot* de la Figura 21B. Se crecieron células en YES exponencialmente a 32°C, luego en MMGlu y finalmente en MMF durante 24 horas (B) Mediante *Western Blot* se analizó la fosforilación en la S64 y los niveles de Igo1 en los fondos mutantes *ppk18Δ* y *cek1Δ* en YES y MMF a 32°C. Como controles, se emplearon extractos de células silvestres, *igo1Δ* e *igo1-S64A* en MMF a 32°C.

Para la ejecución del experimento, se tuvo en cuenta que los promotores *nmt*, después de la eliminación de la tiamina del medio, no inducen la transcripción hasta que la célula agote la tiamina endógena, y a su vez que dicho evento solo ocurre entre las 10 y 12 horas dependiendo de la temperatura del cultivo (Forsburg, 1993; Maundrell, 1993). Por lo tanto, se crecieron cultivo de ambas cepas junto con la cepa silvestre, en MMGlu a 32°C hasta fase exponencial en presencia de tiamina (MMGlu +T, condiciones de represión). Seguidamente, se dividió el cultivo en dos y uno de estos se mantuvo en el mismo medio y el resto de células se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con MMGlu sin tiamina y se inocularon en MMGlu sin tiamina (MMGlu -T, condiciones de inducción). Se recogieron muestras para análisis por FACS y de proteína al tiempo 0 y 12 horas de iniciar la inducción, y de ahí en adelante cada 2 horas hasta las 20 horas.

Igualmente, en cada tiempo se realizó una tinción *in vivo* con *blankophor* con el fin de analizar la evolución de la morfología celular de las cepas mutantes durante el experimento (Figura 22A).

En primer lugar, a través de las tinciones *in vivo* se observa como las células que sobreexpresan Ppk18 en un fondo silvestre *igo1*<sup>+</sup> reducen su tamaño a las 14 horas hasta alcanzar un aspecto ovoide tras 16 horas de inducción (Figura 22C). Alrededor de las 18 horas, se observa un retraso del 50% en el tiempo de generación con respecto a la cepa silvestre, que concluye con un cese en el crecimiento. Al final del experimento, dichas células imitan el aspecto de una célula de *S. pombe* cuando es sometida a privación de nitrógeno. Contrario a esto, las células que sobreexpresan Ppk18 en ausencia de *igo1*<sup>+</sup> no reducen su tamaño, sino que muestran un aspecto similar a *igo1* $\Delta$  hasta las 18 horas.

Mediante el análisis de citometría (FACS), se observó que la sobreexpresión de Ppk18 fue consistente con una entrada a mitosis y una reducción del tamaño a tiempos tempranos. Durante los últimos tiempos, las células se tornan redondas y se agregan, posiblemente por inhibir funciones adicionales del complejo PP2A (Figura 22D).

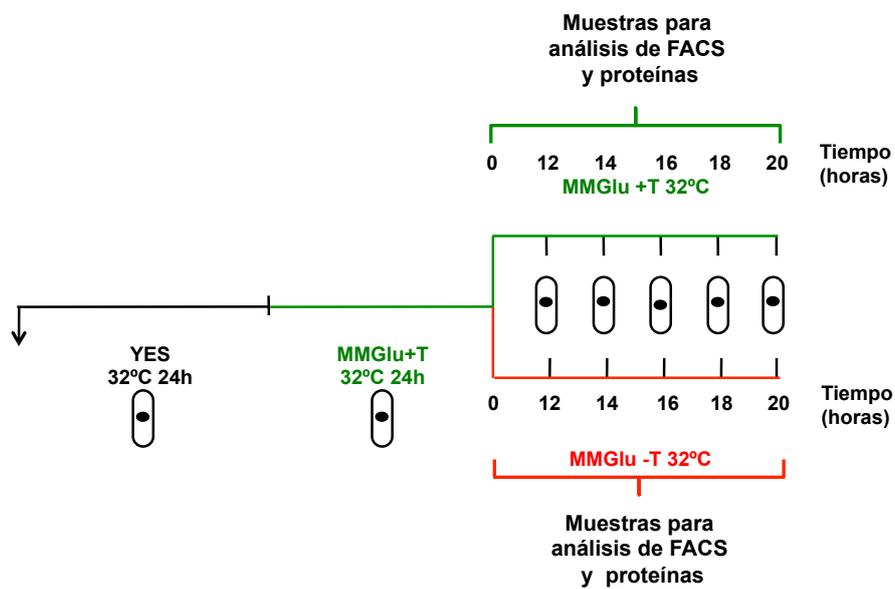
Finalmente, se realizó un *Western Blot* empleando el anticuerpo que reconoce los tres epítopos consecutivos de la hemaglutinina del virus de la influenza (anti-HA) (Figura 22B). Con este análisis se confirmó que ambas cepas sobreexpresaron la forma 3HA-Ppk18 y que la inducción basal se mantuvo en condiciones de represión, de acuerdo a lo esperado con en esta clase de promotor (Forsburg, 1993; Maundrell, 1993). Igualmente empleando el anticuerpo anti-Igo1 y anti-Igo1-P-S64, seguimos los niveles de Igo1 y su fosforilación durante la inducción de expresión de Ppk18. La fosforilación se produce después de las 16 horas de inducción y los niveles de Igo1 son constantes.

La sobreexpresión de Ppk18 induce una entrada prematura a mitosis y una reducción en el tamaño celular a través de la fosforilación de Igo1.

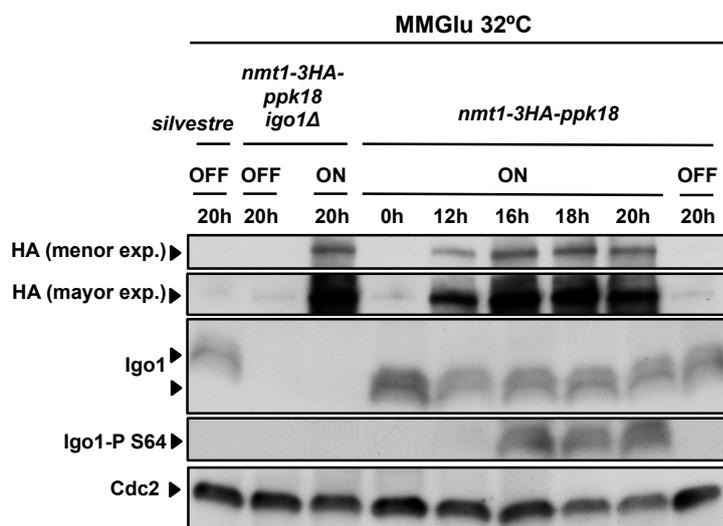
A partir de los resultados obtenidos en el apartado 5, se propone que la actividad de Ppk18 induce la entrada a mitosis a través de la fosforilación del residuo S64 de Igo1 y que dicha fosforilación es dependiente de un estrés nutricional.

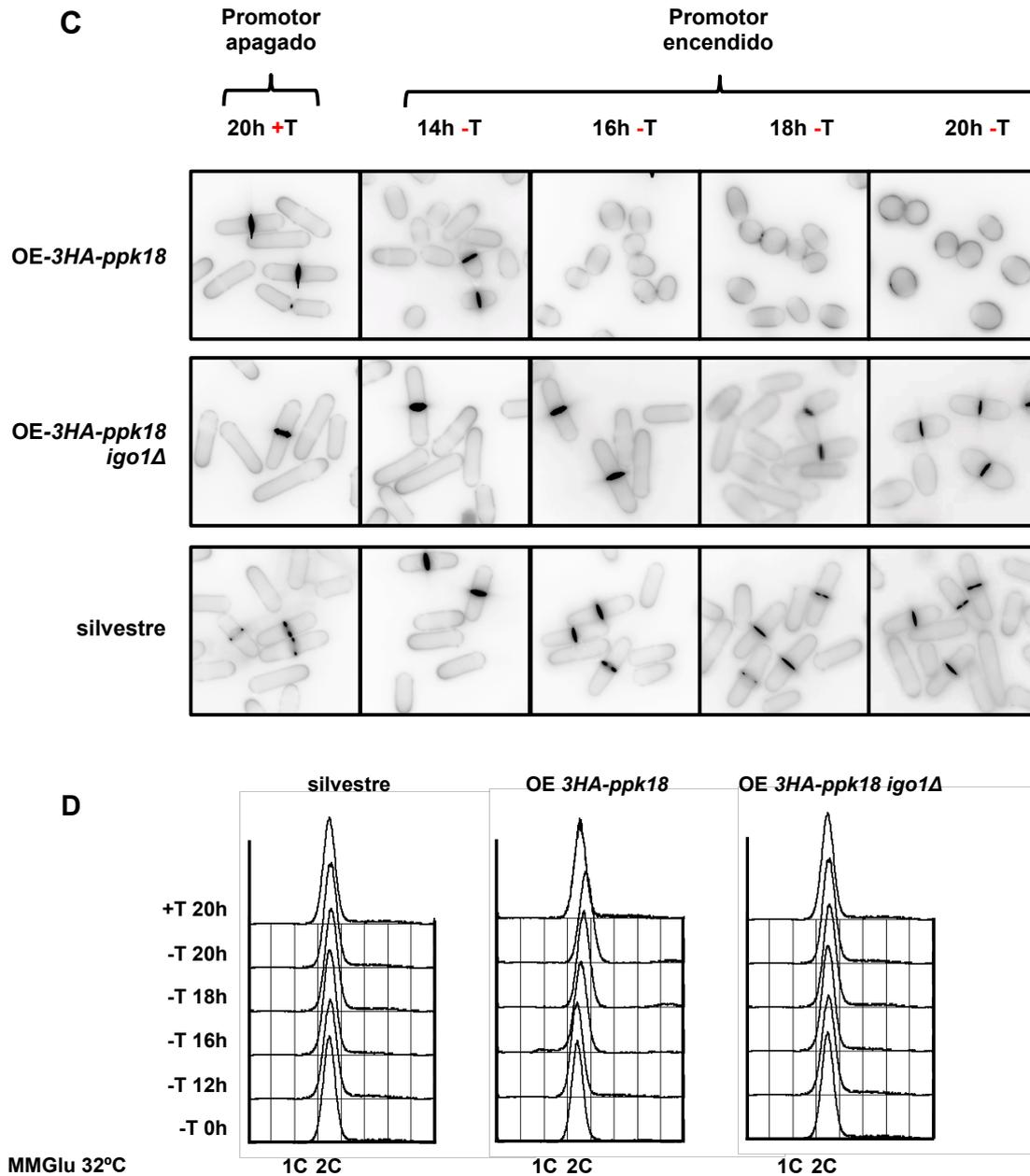
## Resultados-Apartado II

**A**



**B**





**Figura 22.** La sobreexpresión de Ppk18 induce entrada a mitosis y un cese en el crecimiento a través de Igo1. **(A)** Las células que sobreexpresan Ppk18 en presencia y ausencia de *igo1*, se mantuvieron reprimidas en MMGlu +T durante 24 horas a 32°C. A continuación, se transfirieron a MMGlu -T durante 20 horas. Se recogieron muestras para análisis de FACS, de proteínas y tinciones *in vivo* con *blankophor* cada 2 horas, desde las 12 hasta las 20 horas. **(B)** *Western blot* mostrando los niveles y la fosforilación de Igo1 en la S64. Como control negativo, se emplearon extractos de células reprimidas en ausencia y en presencia de *igo1*<sup>+</sup>. Como control de carga se siguieron los niveles de Cdc2. **(C)** Las imágenes corresponden a células teñidas con *blankophor*. **(D)** Análisis de FACS de la cepa silvestre, la sobreexpresora de Ppk18 en presencia y ausencia de Igo1.

### 6. La ruta Ppk18-Igo1-PP2A es un sensor nutricional

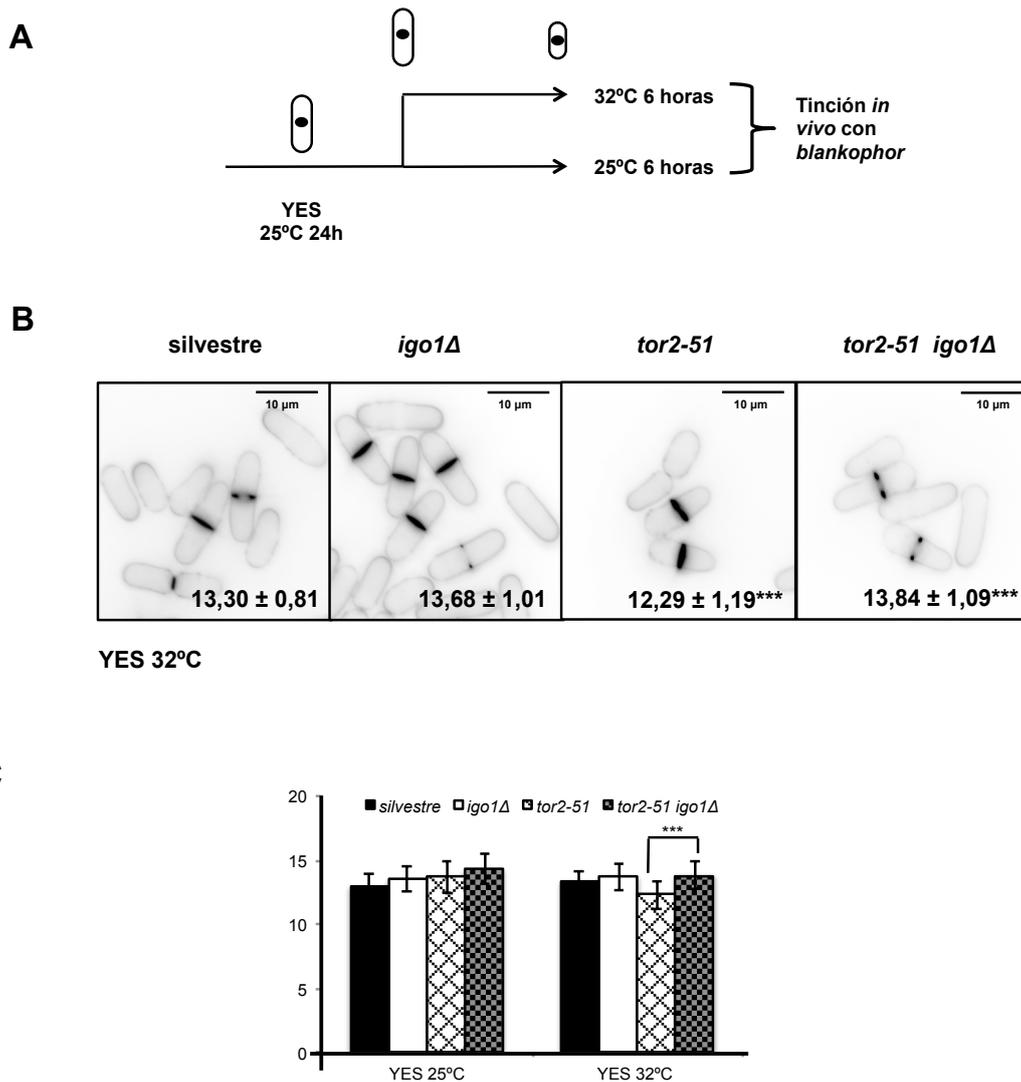
TOR (del inglés *Target of Rapamycin*) es una quinasa muy conservada entre los eucariotas, cuya función es controlar el crecimiento y el tamaño celular en respuesta a cambios en el ambiente nutricional (Wullschieger *et al.*, 2006). La levadura *S. pombe* posee dos quinasas Tor1 (TORC2) y Tor2 (TORC1), siendo esta última esencial (Weisman *et al.*, 2001). La pérdida de Tor2 inhibe el crecimiento celular y promueve la diferenciación celular, imitando la respuesta celular por privación de nitrógeno (Alvarez y Moreno, 2006; Urani *et al.*, 2006; Matsuo *et al.*, 2007) mientras que los mutantes Tor1 son estériles e incapaces de parar en fase G1 bajo las mismas condiciones (Weisman *et al.*, 2007). Aunque aparentemente la función de Tor1 es opuesta a la de Tor2, se ha propuesto que el control en la entrada a mitosis inducido por estrés nutricional, es regulado por ambas proteínas, Tor1 a través de la ruta de estrés MAPK quinasa (Shiozaki y Russell, 1995; Petersen y Nurse, 2007; Hartmuth y Petersen, 2008) y Tor2 a través de un mecanismo aún desconocido (Petersen y Nurse, 2007).

Por otro lado, se ha visto que la regulación del ortólogo de *Greatwall* Rim15 en *S. cerevisiae* es dependiente del complejo TORC1 y de la proteína quinasa A (PKA). En una situación de abundancia de nutrientes, ambas quinasas inactivan a Rim15 y el factor transcripcional necesario para la supervivencia (Pedruzzi *et al.*, 2003; Talarek *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2011). Dicha transcripción es llevada a cabo por los factores Msn2/4 y Gis1 a través de la activación de la vía Rim15-Igo1/2 y la consecuente inhibición del complejo PP2A-Cdc55 (Bontron *et al.*, 2012).

#### 6.1 TORC1 (Tor2) regula negativamente la activación de Igo1

De acuerdo a estos antecedentes y debido a que la sobreexpresión de Ppk18 promueve la entrada a mitosis imitando una situación de estrés nutricional y que las células del mutante *igo1Δ* tienen defectos opuestos a los observados en un mutante defectuoso de Tor2, nuestro siguiente objetivo fue evaluar si la actividad de TORC1 podría regular negativamente la activación del módulo Ppk18-Igo1. Para responder a esto, se determinó el efecto de la inactivación de Tor2 en ausencia de *igo1<sup>+</sup>*, utilizando el mutante termosensible *tor2-51* (Alvarez y Moreno, 2006). En otras palabras, se construyó

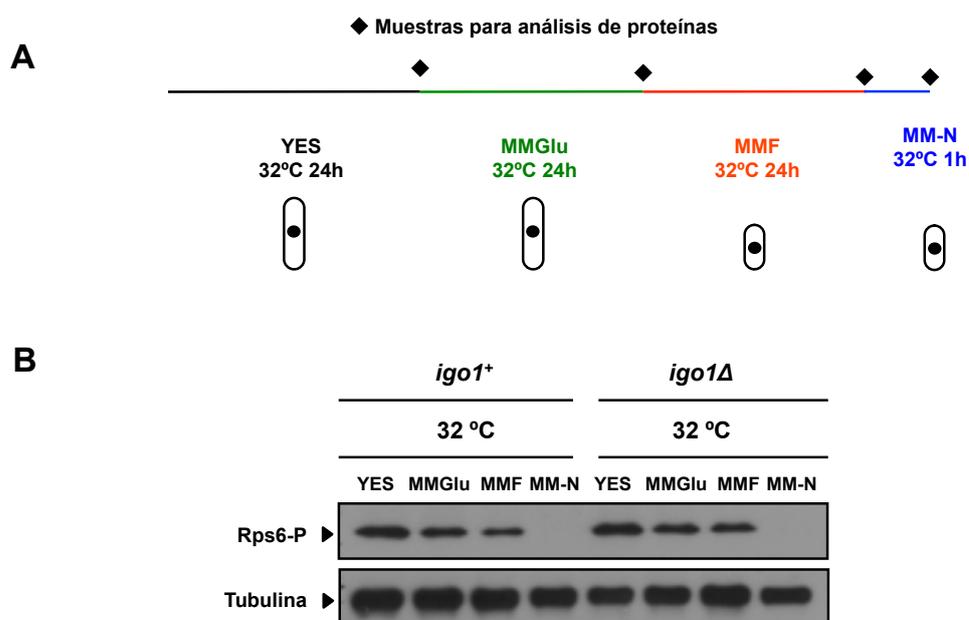
el doble mutante *tor2-51 igo1Δ*, se crecieron las células a temperatura restrictiva (32°C) y se comparó el tamaño celular de este frente a sus parentales. Para este experimento, las células de los mutantes correspondientes se crecieron hasta fase exponencial en YES a 25°C, a continuación se dividieron los cultivos en dos y se incubaron a temperatura permisiva (25°C) y semi-restrictiva (32°C) (Figura 23A).



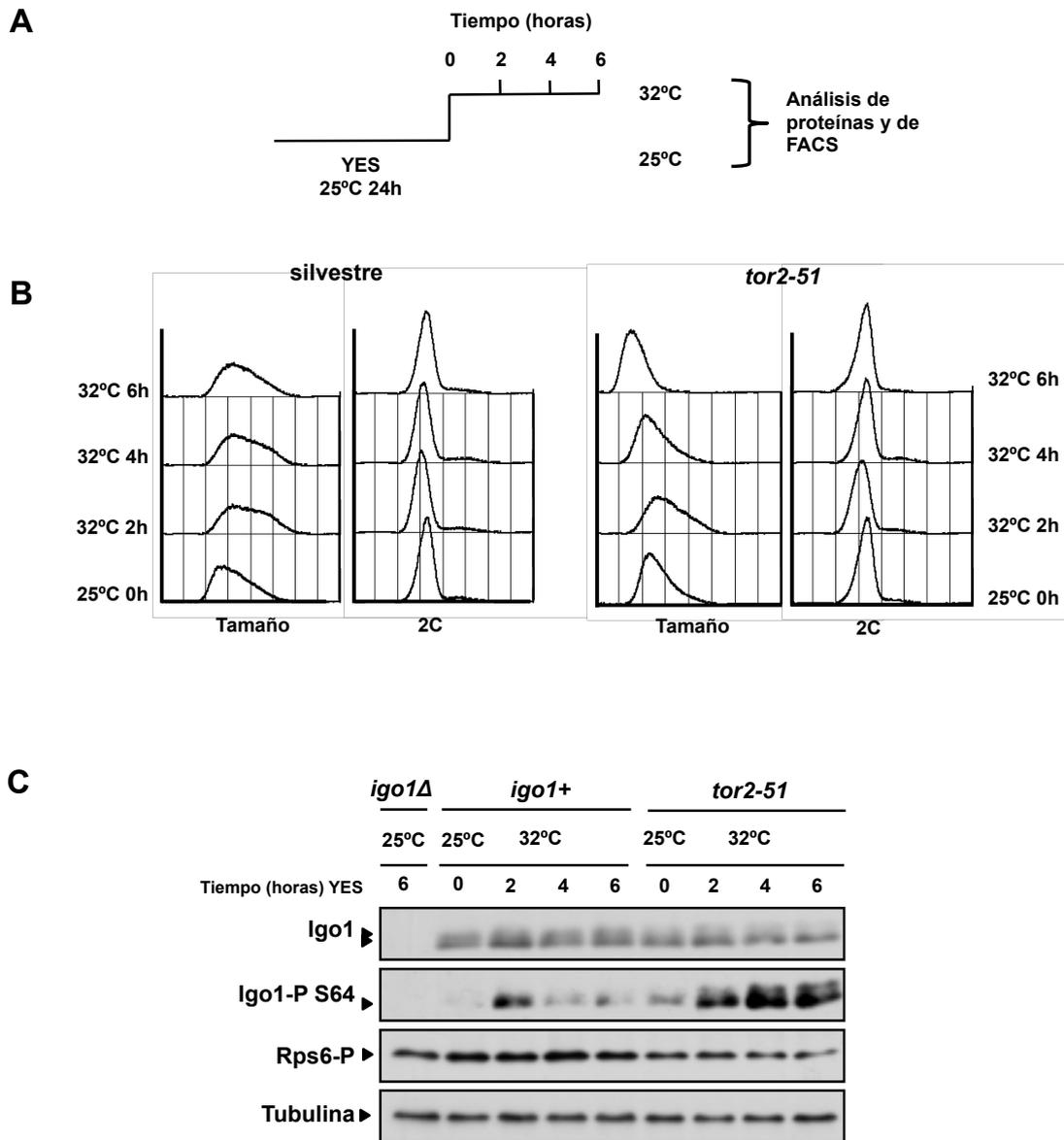
**Figura 23. La activación de Igo1 es dependiente de la actividad de TORC1. (A)** Células silvestres y del mutante *tor2-51*, se crecieron en YES a 25°C durante 24 horas. A continuación, se dividieron en dos cultivos y uno de ellos se transfirió a 32°C (temperatura semi-restrictiva) y el restante se mantuvo a 25°C. Tras 6 horas, se tomaron muestras para medir su longitud celular. **(B)** Las imágenes corresponden a células teñidas con *blankophor*. **(C)** Comparación entre la cepa silvestre y los mutantes *igo1Δ*, *tor2-51*, *tor2-51 igo1Δ*. La longitud celular es representada en  $\mu\text{m} \pm$  la desviación estándar ( $n=100$ ). \*\*\* indica una diferencia significativa con  $p$ -valor  $<0,001$ .

## Resultados-Apartado II

Como muestra la [Figura 23B y 23C](#), las células del mutante *tor2-51* reducen su tamaño mientras estas mismas células en ausencia de *igo1*<sup>+</sup> no, sugiriendo que Igo1 podría estar actuando por debajo del complejo TORC1. De acuerdo a lo observado por Valbuena *et al.*, 2012, la privación de nitrógeno produce una disminución de la actividad Tor2, que puede ser medida a través de la fosforilación de la Rps6 (Nakashima *et al.*, 2009). Por lo tanto, se decidió comprobar si dicho fenómeno también era dependiente de la reducción en la calidad de la fuente de nitrógeno. Para ello, se crecieron células silvestres y del mutante *igo1Δ* en YES a 32°C exponencialmente y luego se transfirieron sucesivamente a MMGlu, MMF y finalmente a MM sin nitrógeno. Las muestras fueron tomadas a las 24 horas en todas las condiciones, a excepción de MM sin nitrógeno dónde fue tomada a la hora ([Figura 24A](#)).



**Figura 24. La actividad de TORC1 disminuye tras una reducción de nitrógeno. (A)** Células silvestres y mutantes *igo1* se crecieron exponencialmente desde YES hasta MM-N, realizando cambios sucesivos de medios a 32°C. Muestras para análisis de proteínas se recogieron a las 24 horas en todos los casos, excepto en MM-N, en el cual la muestra se tomó tras una hora en privación de nitrógeno. **(B)** Mediante *Western Blot* se analizó la fosforilación de Rps6, como medida de la actividad de TORC1 en un fondo silvestre e *igo1Δ*.



**Figura 25.** La fosforilación de Igo1 se induce a medida que la actividad de TORC1 disminuye. **(A)** Células silvestres y del mutante *tor2-51* se crecieron en YES a 25°C durante 24 horas. Luego, se transfirieron desde 25°C a 32°C durante 6 horas. Se tomaron muestras cada dos horas para análisis de FACS y de proteínas. El tiempo cero horas fue tomado antes del incremento de temperatura. **(B)** Análisis de FACS correspondiente a la inactivación de Tor2-51 a 32°C durante 6 horas. La comparación es hecha frente a la cepa silvestre. **(C)** Mediante *Western Blot*, se analizó los niveles y la fosforilación de Igo1 durante la inactivación progresiva de la actividad de Tor2 (TORC1). Como control de actividad de Tor2 se evaluó la fosforilación de Rps6. Como controles negativos se usaron extractos de células del mutante *igo1Δ* en YES a 25°C y extractos de la cepa silvestre sometidas al mismo cambio de temperatura.

## Resultados-Apartado II

En dicho experimento, se observa una reducción progresiva de la actividad de Tor2 asociada a la reducción de nitrógeno tanto en las células silvestres como en las del mutante *igo1Δ* (Figura 24B), sugiriendo que exponer las células a crecer en medio MMF es equivalente a reducir la actividad de Tor2.

Teniendo en cuenta el anterior resultado, se evaluó si la inactivación de Tor2 podría dar lugar a una activación de Igo1 dependiente de Ppk18. Para ello, se crecieron células silvestres y del mutante *tor2-51* en YES a 25°C hasta fase exponencial y se transfirieron a 32°C durante 6 horas (Figura 25A). Se tomaron muestras a 0, 2, 4 y 6 horas. De acuerdo al análisis de FACS, la inactivación de Tor2 promueve una reducción de tamaño evidente hasta las 6 horas, tiempo en el cual aún la fase G1 permanece críptica (Figura 25B). La Figura 25C muestra como la inactivación de Tor2 induce la fosforilación de la S64 de Igo1, incluso desde niveles basales de actividad (25°C) en comparación con la cepa silvestre, indicando una activación dependiente de la actividad de Tor2. De igual manera, se observa como el incremento de temperatura desde 25°C a 32°C induce un pulso de fosforilación de Igo1 tras una hora. Tras la adaptación de las células a la temperatura, esta fosforilación vuelve a ser basal extractos de células del mutante *igo1Δ* en YES a 25°C y extractos de la cepa silvestre sometidas al mismo cambio de temperatura.

Por tanto, la limitación de nitrógeno induce la disminución de la actividad de Tor2 y a su vez induce la fosforilación de Igo1.

### 6.2 La proteína quinasa A (PKA) regula negativamente la activación de Igo1

La actividad de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA), constituye otra ruta de señalización celular que controla el crecimiento en respuesta a nutrientes (Shabb *et al.*, 2001). En la levadura de fisión, PKA dirige la proliferación e inhibe la diferenciación sexual. La delección de *pka1<sup>+</sup>* genera células pequeñas y promueve el desarrollo sexual en medio rico (Yamawaki-Kataota *et al.*, 1989; Maeda *et al.*, 1994; Valbuena y Moreno, 2010). Dado que la activación de Igo1 es dependiente de una caída en la actividad de Tor2, de igual forma podría ser dependiente de la actividad de PKA, como se ha sugerido en *S. cerevisiae* en el contexto de la quiescencia.

Para analizar esta hipótesis, en una primera aproximación se evaluó el comportamiento

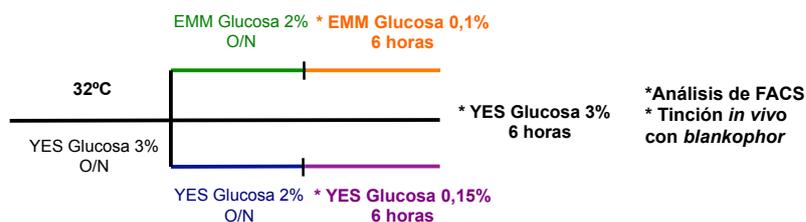
de la delección del gen *igo1*<sup>+</sup> por separado y en combinación con la delección de *pka1*<sup>+</sup> en una situación de limitación por glucosa. Para ello, se construyó el doble mutante *pka1Δ igo1Δ* y se comparó su tamaño celular frente a sus parentales y la cepa silvestre. Durante el experimento, se redujo progresivamente la glucosa disponible en el medio, analizando el tamaño celular de las cepas en YES Glucosa 3%, YES Glucosa 0,15% y EMM Glucosa 0,1% (Figura 26A). Las muestras para tinción con *blankophor* fueron tomadas una vez transcurridas 6 horas en cada medio. Paralelamente, se tomaron muestras para análisis de FACS. Los medios con mas baja glucosa fueron suplementados con glicerol 3% para evitar estrés osmótico.

La Figura 26B muestra que la cepa silvestre reduce el tamaño celular en MM con glucosa 0,1%, hasta niveles *pka1Δ*, sugiriendo que la actividad de Pka1 se reduce sólo cuando las células crecen en 1/20 de la concentración glucosa estándar empleada en el laboratorio. Bajo estas mismas condiciones, las células que carecen de *igo1*<sup>+</sup> no reducen su tamaño como la cepa silvestre y dicho tamaño celular se mantiene en un fondo que carece de *pka1*<sup>+</sup>, indicando que, en una situación de estrés por glucosa, la ausencia de *igo1*<sup>+</sup> provoca un retraso en la fase G2 e igualmente, que la entrada a mitosis provocada por la inactivación de *pka1*<sup>+</sup> es dependiente de la actividad de Igo1. En el análisis de FACS realizado, se observa un solo pico 2C para todas las cepas evaluadas (datos no mostrados).

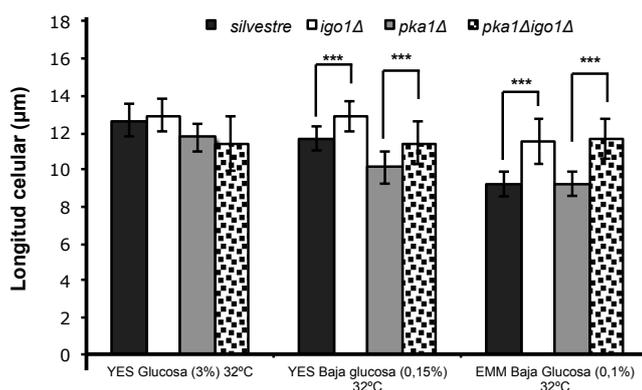
De la misma forma que se equiparó la disminución de la actividad de Tor2 con la reducción del nitrógeno, para este caso se asumió que la reducción en la fuente de glucosa sería equivalente a una caída en la actividad de PKA. Para comprobar esto, se analizó la fosforilación de Igo1 en un cambio nutricional por glucosa. Para ello, se crecieron células en EMM Glucosa 2% exponencial a 32°C y a continuación se dividió el cultivo para crecerlas paralelamente en EMM Glucosa 2% y EMM Glucosa 0,1%. Se tomaron muestras al cabo de 6 horas (Figura 27A). Como resultado de la reducción en la cantidad de glucosa, se indujo la fosforilación de Igo1, sugiriendo que su actividad no sólo es dependiente de Tor2 sino también de PKA (Figura 27B). Asimismo, se observa como la reducción de glucosa inhibe la fosforilación de Rps6 a través de TORC1, sugiriendo que al disminuir la glucosa en el medio, también se inactiva TORC1. Como control de la caída de la actividad de PKA en este experimento, se midió la longitud celular de la cepa silvestre y el mutante *igo1Δ* y se confirmó nuevamente lo observado en la Figura 26B, una reducción del tamaño celular de la cepa silvestre y una menos pronunciada

## Resultados-Apartado II

**A**



**B**

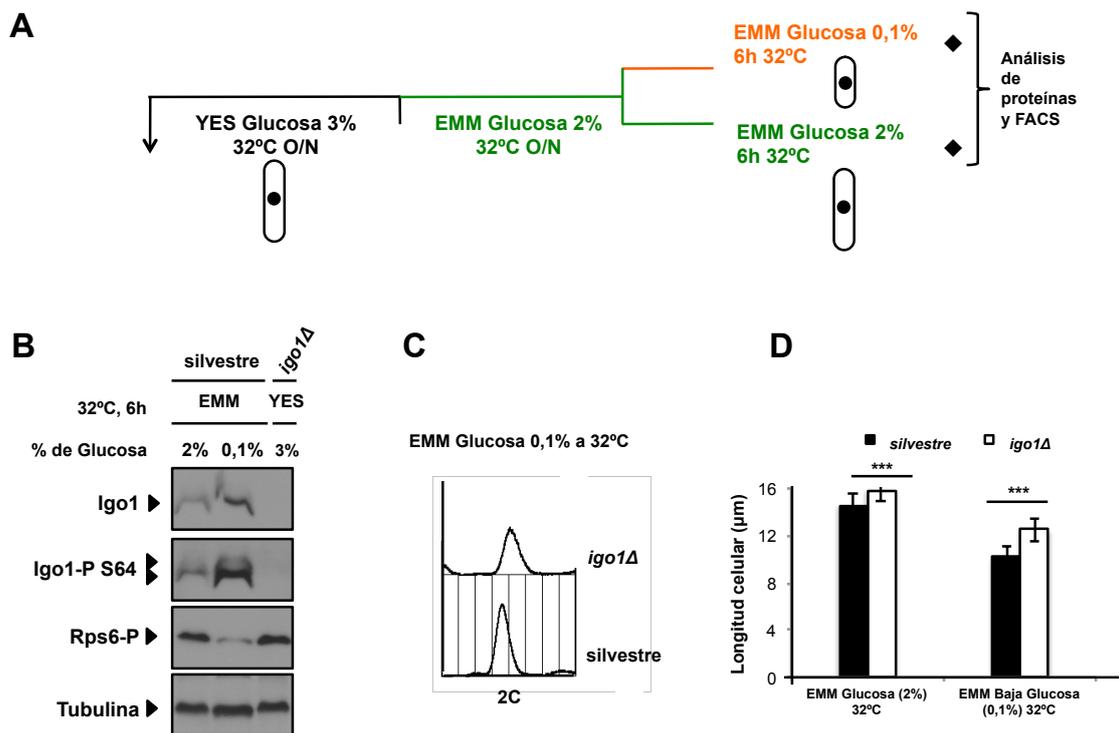


**Figura 27. Análisis epistático entre los mutantes *igo1Δ* y *pka1Δ* en medios con baja glucosa. (A)** Las células silvestres y los mutantes *igo1Δ*, *pka1Δ*, *igo1Δ pka1Δ* se sometieron a una reducción progresiva en la cantidad de glucosa a 32°C durante 6 horas en cada condición. Se añadió glicerol 3% para evitar estrés osmótico por reducción en los niveles glucosa. Las muestras se recogieron para tinción *in vivo* con *blankophor* y análisis de FACS. **(B)** Comparación entre la cepa silvestre y los mutantes *igo1Δ*, *pka1Δ*, *igo1Δ pka1Δ*. La longitud celular es representada en  $\mu\text{m} \pm$  la desviación estándar ( $n=100$ ). \*\*\* indica una diferencia significativa con  $p$ -valor  $<0,001$ .

en el mutante. De igual forma, se analizó el perfil de FACS, con el cual se observa como las células a pesar de reducir su tamaño no expanden la fase G1, sugiriendo que el bloqueo final de estas células ocurre en fase G2 (Figura 27C).

*Igo1* es necesario para acelerar la entrada a mitosis en baja glucosa, lo cual sugiere que la fosforilación y la activación de *Igo1* es dependiente de una reducción en la actividad de TORC1 y PKA.

A partir de los resultados obtenidos en el apartado 6, se propone que TORC1 (Tor2) y PKA regulan negativamente la activación de *Igo1*.



**Figura 28. La actividad de Igo1 es dependiente de estrés por glucosa.** (A) Células de la cepa silvestre y del mutante *igo1Δ*, se crecieron en medios ricos en glucosa (YES Glucosa 3% y EMM Glucosa 2%). Luego, se dividieron en dos cultivos que se sometieron por separado a crecer en una condición óptima de glucosa (EMM Glucosa 2%) y en una pobre (EMM Glucosa 0,1%) a 32°C. Se añadió glicerol 3% para evitar estrés osmótico. Se recogieron muestras después de 6 horas, para análisis de FACS y proteína. (B) Mediante *Western Blot* se analizó los niveles y la fosforilación de Igo1 y de Rps6. Como control negativo, se empleó un extracto de células de *igo1Δ* en YES Glucosa 3% a 32°C, recogido tras 6 horas de crecimiento en fase exponencial.

## 7. La actividad de Igo1 es independiente de otros mecanismos de regulación de entrada a mitosis en *S. pombe*

Otras rutas de control de la entrada mitosis se han propuesto en *S. pombe*. Una de ellas, es la ruta de señalización que acopla el crecimiento con la división celular a través de la cascada de quinasas Pom1-Cdr1/Cdr2-Wee1. De acuerdo al modelo, en interfase Pom1 favorece la actividad de Wee1 a través de la inhibición de las quinasas Cdr1/Cdr2 hasta que las células alcancen el tamaño apropiado para una división celular exitosa (Bähler y Nurse, 2001; Martin y Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley *et al.*, 2009). Otra, mencionado con anterioridad, es la señalización TOR que regula la entrada a mitosis a través de la ruta de estrés MAPK y Polo quinasa en respuesta a estrés por

## Resultados-Apartado II

nutrientes (Petersen y Nurse, 2007).

Con el fin de evaluar si Igo1 podría actuar como un módulo independiente de la actividad de estas rutas, se combinó la delección de *igo1Δ* con los mutantes *pom1Δ*, *cdr1Δ*, *sty1Δ* y *pyp2Δ* y realizamos un análisis epistático de acuerdo a variaciones en el tamaño celular. Para ello, las células se crecieron hasta fase exponencial en MMGlu y MMF a 32°C y se tiñeron con *blankophor* (ver metodología, Figura 12A). En la Tabla 3, se indican los valores de longitud celular observado en cada mutante.

En MMG, la combinación de la mutación de *cdr1Δ* o *pom1Δ* con *igo1Δ* es aditiva, ya que en el primer caso incrementa la longitud celular en el doble mutante con respecto a sus parentales y en el segundo es intermedia. Lo mismo se observa con la combinación *igo1Δ sty1Δ*, sugiriendo que ambas rutas controlan la entrada a mitosis en una situación de estrés por nitrógeno. En el caso con el gen *pyp2<sup>+</sup>*, las células del doble mutante son tan largas como la delección de *igo1<sup>+</sup>*, sugiriendo una compensación por la pérdida de actividad de Sty1 en estas condiciones, que será mejor analizada en la discusión. Esto mismo ha sido observado en MMF, excepto con *sty1<sup>+</sup>*, ya que las células del mutante sencilla y en combinación con *igo1Δ*, son inviables en estas condiciones. De acuerdo a la interpretación de estas interacciones, se propone que la actividad de Igo1 a través de la ruta Ppk18-Igo1-PP2A, es independiente de los otros módulos conocidos como reguladores de la entrada mitosis en *S. pombe*.

De acuerdo a los análisis epistáticos expuestos, la actividad de la ruta Ppk18-Igo1-PP2A es independiente de la actividad Pom1-Cdr1/Cdr2-Wee1 o de Pyp2-Sty1-Cdc25 en *S. pombe*.

**Tabla 3. Análisis epistático entre *igo1Δ* y otros reguladores de mitosis en MMG y MMF a 32°C**

Cepa	Long. celular MMG (μm ± d.e)	p-valor	Long. celular MMF (μm ± d.e)	p-valor	Interacción genética
silvestre	15,46 ± 1,12	---	11,9 ± 0,99	---	----
<i>igo1Δ</i>	16,43 ± 1,33	---	18,61 ± 1,58	---	---
<i>cdr1Δ</i>	17,33 ± 1,12	10 <sup>-12</sup>	16,88 ± 1,54	10 <sup>-19</sup>	---
<b><i>cdr1Δ igo1Δ</i></b>	<b>18,75 ± 1,3</b>	<b>10<sup>-32</sup></b>	<b>20,62 ± 1,38</b>	<b>10<sup>-26</sup></b>	<b>Aditiva en MMG y MMF</b>
<i>pom1Δ</i>	12,95 ± 1,52	10 <sup>-41</sup>	10,19 ± 1,25	10 <sup>-84</sup>	---
<b><i>pom1Δ igo1Δ</i></b>	<b>14,42 ± 1,94</b>	<b>10<sup>-17</sup></b>	<b>13,68 ± 1,29</b>	<b>10<sup>-61</sup></b>	<b>Aditiva en MMG y MMF</b>
<i>pyp2Δ</i>	14,63 ± 1,3	10 <sup>-25</sup>	13,34 ± 1,3	10 <sup>-63</sup>	---
<b><i>pyp2Δ igo1Δ</i></b>	<b>16,99 ± 1,27</b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>17,1 ± 1,8</b>	<b>10<sup>-13</sup></b>	<b>Aditiva en MMF</b>
<i>sty1Δ</i>	22,74 ± 1,39	10 <sup>-67</sup>	Inviable	---	---
<b><i>sty1Δ igo1Δ</i></b>	<b>26,59 ± 2,29</b>	<b>10<sup>-68</sup></b>	<b>Inviable</b>	<b>---</b>	<b>Aditiva en MMG y MMF</b>

La longitud celular es representada como la media (en μm) de 100 células septadas ± la desviación estándar. El p-valor fue calculado, mediante el test T de *Student*, para una muestra entre la longitud del mutante *igo1Δ* y las longitudes de cada uno de los mutantes analizados. El nivel de significancia empleado fue de 1x10<sup>-5</sup>.

# Discusión

## APARTADO I

### 1. Mapa funcional de la regulación de la Cdk en *S. pombe*

En *S. pombe* se han construido 4865 mutantes de delección (99% de los marcos de lectura abierta) incluyendo 1268 para genes esenciales y 3597 para genes no esenciales (Kim *et al.*, 2010; Spirek *et al.*, 2010). El gran número de genes no esenciales sugiere que las células de *S. pombe* poseen múltiples mecanismos de tolerancia que han evolucionado sobre la base de la redundancia funcional de los genes. Esta redundancia ha impedido la caracterización de ciertos genes, ya que su simple interrupción no es suficiente para generar un fenotipo interpretable.

Tong *et al.*, en 2001 desarrollaron la aproximación de genómica funcional SGA que permite la construcción masiva de dobles mutantes y la identificación de interacciones sintéticas letales fundamentalmente. La principal ventaja de llevar a cabo un escrutinio masivo de sintéticos letales (SGA), es que la redundancia funcional puede ser resuelta mediante la identificación de genes que se tornan esenciales para la viabilidad celular en ausencia de otro gen (sintéticos letales) o la identificación de genes cuyas mutaciones agravan la penetrancia fenotípica de una mutación en un segundo gen (sintético enfermo).

En este estudio, se construyeron cerca de 7000 dobles mutantes, cruzando la v3.0 de la colección de genes no esenciales de *S. pombe* (KRIBB-Bioneer-CRUK) con los mutantes *wee1-50* y *cdc2-3w*, con el fin de analizar sus interacciones genéticas e identificar nuevos genes reguladores del ciclo celular en *S. pombe*. Las interacciones genéticas se establecieron puntuando visualmente el crecimiento celular de los dobles mutantes y normalizándolo en función del crecimiento de sus parentales (Figura 1 ver, Resultados Apartado I). Entre las parejas genéticas analizadas, se identificaron 593 mutantes con interacciones genéticas negativas o positivas según el caso (Figura 5 ver, Resultados Apartado I). La mayoría de los dobles mutantes mostraron un perfil de interacción neutro (puntuación igual a cero), en el cual éstos mostraban la misma viabilidad que el mutante sencillo. Estas observaciones experimentales concuerdan con el modelo neutral de las interacciones genéticas, el cual asume que normalmente dos

## Discusión

genes no se afectan funcionalmente entre sí y que las interacciones genéticas ocurren en baja frecuencia (Tong *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2004; Schuldiner *et al.*, 2005).

El análisis de los mutantes identificados fue realizado por grupos que se denominaron módulos de interacción. En el módulo de interacciones genéticas negativas, se identificaron 217 y 210 mutantes con *wee1-50* y *cdc2-3w*; y en el módulo de interacciones positivas, se identificaron 70 y 96 supresoras con *wee1-50* y *cdc2-3w* respectivamente (Figura 6 y 8 ver, Resultados Apartado I). Con base en la puntuación de interacción obtenida, se determinó el grado de las interacciones para cada módulo (Figura 6 y 8 ver, Resultados Apartado I). Tanto en el módulo de interacciones negativas como el de las positivas, se observó que la gran parte de elementos que los conforman, son mutantes que manifiestan interacciones débiles con las cepas de interés, probablemente por la presencia de otros genes que aumentan la tolerancia al desequilibrio funcional y mantienen la viabilidad de la célula. Esta característica ha sido observada en otras redes de interacción identificadas en *C. elegans* y *S. cerevisiae* (Byrne *et al.*, 2007; Costanzo *et al.*, 2010; Poyatos, 2011).

Durante la fase G2 en *S. pombe*, la regulación de la actividad del complejo Cdc2-Cdc13 depende principalmente de la quinasa Wee1 y la fosfatasa Cdc25 (Russell y Nurse, 1986 y 1987a). Las células que portan el alelo condicional *wee1-50* entran prematuramente en mitosis por una reducción en la actividad de la quinasa Wee1 cuando crecen a 35°C, mientras que las que portan la mutación *cdc2-3w* avanzan prematuramente hacia mitosis por una mutación en la Cdc2 (C67Y) que imita la sobreexpresión de la fosfatasa Cdc25 (Booher y Beach, 1986; Carr *et al.*, 1989). En este estudio, la interpretación que damos a los sintéticos letales identificados, varía en función de la naturaleza de los alelos empleados en el escrutinio (por ej. alelos nulos, condicionales e hiperactivos). Con *wee1-50*, las interacciones negativas se explican por la alteración de una proteína que actúa en una ruta independiente a la de la quinasa Wee1 o por la alteración de una proteína que funciona en su misma ruta, ya que la actividad de Wee1 a 35°C no está completamente inhibida. Esto indica que los genes sintéticos letales con *wee1-50* actúan como posibles reguladores positivos de la actividad de Wee1, ya sea por encima de esta quinasa (por ej. Pom1; Martin y Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley *et al.*, 2009) o en una ruta paralela de regulación de la entrada a mitosis (por ej. Ppa2 como regulador negativo de la proteína Cdc25; Kinoshita *et al.*, 1993 o Mik1 como una proteína redundante a la función de Wee1; Lundgren *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1994).

Con *cdc2-3w*, las interacciones negativas se explican como resultado de la alteración de una proteína que actúa como regulador positivo de Wee1, ya que se asume que este mutante es insensible a cambios en la actividad de Cdc25, pero aún sensible a la actividad de Wee1 (Russell y Nurse, 1986; Sveiczer *et al.*, 1999). Por tanto, en un mutante *wee1-50* la sinteticidad letal proviene de un desequilibrio tanto en la actividad Wee1 y Cdc25, mientras que en el mutante *cdc2-3w* sólo por un desequilibrio en la regulación de la actividad de Wee1.

Si esto es así, es posible que las 119 interacciones negativas identificadas en común con *wee1-50* y *cdc2-3w*, sean la consecuencia de una alteración en la regulación negativa de la entrada a mitosis a través de un mecanismo presente en los dos mutantes (regulación de la actividad de Wee1), mientras que las 98 únicas a *wee1-50* y las 91 a *cdc2-3w* estén subordinadas a características específicas de cada uno (Figura 7 ver, Resultados Apartado I). En células humanas se ha propuesto que Wee1 mantiene la estabilidad genómica a través de la regulación negativa de complejos que participan en la respuesta al daño en el ADN como Mus81-Eme1 (Domínguez-Kelly *et al.*, 2011). Por tanto, estas interpretaciones sobre la sinteticidad letal podrían ser trasladadas a otros contextos biológicos, en los cuales la quinasa Wee1 cumpla una función celular adicional al control de la entrada a mitosis. Sin embargo dichas funciones aún no han sido demostradas en *S. pombe*.

Si es cierto que el mutante *cdc2-3w* es insensible a la regulación de Cdc25, cabría esperar que parte de las interacciones negativas, como producto de la alteración de la función de Cdc25, sólo resulten con el fondo genético *wee1-50*. Mientras que si la mutación *cdc2-3w* imita una hiperactivación de la Cdk, las interacciones negativas exclusivas con este mutante, sean el resultado de la ausencia de proteínas que reprimen la activación del complejo Cdc2-Cdc13, (por ej. proteínas involucradas en la regulación de factores que controlan la síntesis y la degradación de ciclinas (APC-Ste9; Kitamura *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 2000) o en la regulación de inhibidores de la Cdk (CKIs; Rum1 y Sic1; Sánchez-Díaz *et al.*, 1998). Lkh1, el primer regulador positivo reportado para Rum1 (Yu *et al.*, 2013), presentó una interacción negativa débil con *wee1-50* (Tabla S1 ver, Material Suplementario), lo que sugiere la existencia de otros reguladores aún no descritos.

## Discusión

La [Figura 12](#) (ver, [Resultados Apartado I](#)) permite visualizar las interacciones negativas fuertes comunes y únicas a cada cepa de interés. En el caso de aquellas únicas con *cdc2-3w*, el número elevado de genes asociados con biogénesis de ribosomas sugiere la existencia de una coordinación entre los niveles de actividad de la Cdk y la maquinaria de traducción en *S. pombe*. Como apoyo a esta hipótesis, se ha propuesto que la actividad de Wee1 es necesaria para retrasar la entrada a mitosis en respuesta a la inhibición de la síntesis de proteínas en *S. pombe* (Suda *et al.*, 2000), lo cual sugiere que una actividad alta de la Cdk bajo una síntesis de proteínas comprometida podría causar la pérdida de viabilidad.

Teniendo en cuenta que ambos mutantes *wee* presentan una fase G2 más corta y células más pequeñas en comparación con la cepa silvestre (Nurse, 1975; Nurse y Thuriaux, 1980; Fantes 1981), la sinteticidad letal de estos mutantes se pueden explicar: **i)** si las células no tienen suficiente tiempo para completar la replicación del ADN antes de iniciar la mitosis, como sucede en los mutantes del *checkpoint* de replicación o el mutante *mik1Δ* (Rad 1,3,9,17 y Hus1; [Figura 12 ver, Resultados Apartado I](#)) los cuales mueren por catástrofe mitótica (Russell y Nurse, 1986; Lundgren *et al.*, 1991; Enoch *et al.*, 1992; Rowley, 1992) (ver [categoría replicación; Tabla S1 y S2](#)); **ii)** si la fase G1 es muy corta como sucede en el doble mutante *wee1-50 rum1Δ*, que muere muy pequeño (Moreno y Nurse, 1994) (ver [categoría regulación del ciclo celular; Tabla S1 y S2](#)), **iii)** si hay problemas de segregación cromosómica que acaban en catástrofe mitótica, como sucede cuando se elimina el gen esencial Mcl1 en un fondo *wee1-50* (Williams y McIntosh, 2002) (ver [categoría reparación del ADN y mitosis; Tabla S1 y S2](#)), **iv)** cuando el control G2/M sea importante para evitar la citoquinesis (Liu *et al.*, 2000) (ver [categoría morfogénesis y citoquinesis; Tabla S1 y S2](#)).

Mediante el uso de técnicas derivadas del SGA, tales como el **E-MAP** (del inglés *Epistatic miniarray profiles*) y el **CGA** (del inglés *Chemical Genetic Array*), se han identificado interactomas genéticos, que describen globalmente el equilibrio molecular y celular en *S. pombe* (Frost *et al.*, 2012; Ryan *et al.*, 2012) y en *S. cerevisiae* (Costanzo *et al.*, 2010) y una red que conecta la función de la CDK con múltiples procesos celulares en *S. cerevisiae* (Zimmermann *et al.*, 2011) respectivamente. En *S. pombe* aún no se ha realizado el primer escrutinio de sintéticos letales que involucre mutantes del ciclo celular. No obstante, un escrutinio que consistió en la identificación de mutantes con células pequeñas, reveló la existencia de rutas de control de la entrada a mitosis independientes

de la ruta de estrés y la ruta que coordina el tamaño con la división (Navarro y Nurse, 2012). De los 18 genes identificados, sólo 5 fueron comunes a nuestros datos (*zfs1*<sup>+</sup>, *pom1*<sup>+</sup>, *clp1*<sup>+</sup>, *snf5*<sup>+</sup>, *ppa2*<sup>+</sup>), sugiriendo que otros fenotipos adicionales a un tamaño celular reducido pueden provocar la pérdida de viabilidad en mutantes tipo *wee*.

Teniendo en cuenta que el 97% de los genes identificados en este escrutinio, tiene un ortólogo conservado en eucariotas superiores (Tabla S4 y S5 ver, Material Suplementario), las redes de interacción presentadas aquí deberían ser extrapolables a otros organismos, con el fin de proporcionar una nueva visión sobre las capas de regulación de la Cdk conservadas a lo largo en la evolución. Debido a que los elementos del control de la transición G2/M en la levadura de fisión, funcionalmente son más similares a los de las células humanas que a los de *S.cerevisiae*, la principal utilidad de estos resultados, es que permite identificar nuevos reguladores de ciclo celular en células animales.

## 2. Análisis de la composición de las redes de interacción genética identificadas

Como se ha mencionado, la transición G2/M es regulada por la actividad de Wee1 y Cdc25, cuya actividad está regulada por elementos que actúan cerca de la capa primaria de regulación, pero también en capas secundarias que conectan con la maquinaria central del ciclo celular. Estas capas secundarias pueden definir procesos y componentes celulares, que pueden ser identificados mediante un análisis de ontología genética (del inglés *Gene Ontology*, GO). Para identificar estas capas, se emplearon las herramientas *Gene list Analyzer* del Instituto Wellcome Trust Sanger y BiNGO (Tabla 2 y 3; Figura 14 y 15 ver, Resultados Apartado I). En conjunto, estos análisis funcionales señalaron que la regulación de la progresión hacia mitosis, requiere fundamentalmente de tres procesos, la integridad del ADN, la segregación cromosómica y la señalización celular. Estas observaciones se apoyan en interacciones identificadas en nuestro escrutinio que ya han sido previamente descritas en *S. pombe* como: **i)** la dependencia entre la replicación y la mitosis a través de las proteínas Rad (Enoch *et al.*, 1992; al-Khodairy y Carr, 1992 y al-Khodairy *et al.*, 1994); **ii)** el *checkpoint* del huso mitótico a través de la fosforilación de Bub1 por la Cdk (Yamaguchi *et al.*, 2003) y **iii)** la actividad de proteínas fosfatasas como antagonistas de la actividad de la Cdk (Novak *et al.*, 2010b; Domingo-Sananes *et al.*, 2011) a través de proteínas conocidas como PP2A (Ppa2) (Kinoshita *et al.*, 1993) y Clp1

## Discusión

(Wolfe *et al.*, 2004; Esteban *et al.*, 2004).

La determinación de estas capas de regulación, podrían predecir la función de genes que aún permanecen sin un papel asociado al ciclo celular, como es el caso del gen *rnc1<sup>+</sup>* (*rnc1Δ* es sintético letal con *wee1-50* y no con *cdc2-3w*; [Tabla S1 ver, Material Suplementario](#)), cuyo producto génico es una proteína de unión a ARN que regula negativamente la actividad de Pmk1 a través de la fosfatasa Pmp1 (Sugiura *et al.*, 2003). Pmk1 es una de las MAP quinasas que regula la integridad de la pared celular (Toda *et al.*, 1996) que a su vez es parcialmente regulada por la quinasa Sty1, el principal elemento de la ruta de estrés en *S. pombe* (Madrid *et al.*, 2006). De acuerdo a resultados preliminares de nuestro grupo, en un análisis de expresión realizado al mutante *rnc1Δ*, se observó una sobreexpresión de genes necesarios para la conjugación, lo cual podría ser justificado a través de una activación del factor de transcripción Atf1 mediada por la actividad de Sty1 (Shiozaki y Russell, 1996). Sty1 ha sido implicada en control del ciclo celular, ya que su actividad favorece la activación de Cdc25 vía Polo quinasa (Plo1) (Petersen y Nurse, 2007) Nuestros análisis funcionales ubican a Rnc1 con la proteína fosfatasa Clp1 ([Tabla S7 ver Material Suplementario](#)), lo cual sugiere que Rnc1 a través de Sty1-Cdc25 podría tener un papel como regulador negativo de la actividad de la Cdk, al igual que Clp1 a través de la regulación negativa de la actividad de Cdc25 (Esteban *et al.*, 2004). Debido a que el gen *rnc1<sup>+</sup>* es un potencial candidato como regulador del ciclo celular, también deberían serlo otros genes (*pxl1<sup>+</sup>*, *cch1<sup>+</sup>*, *yam8<sup>+</sup>*, *cnb1<sup>+</sup>*, entre otros) que se agrupan junto con este en la categoría funcional de señalización celular ([Figura 12 ver, Resultados Apartado I](#)).

### 3. Nuevos reguladores del ciclo celular en *S. pombe*: Predicción de función y relaciones

Según Mani *et al.*, 2008, las mutaciones combinadas en dos genes producen un fenotipo que puede revelar relaciones funcionales entre genes, entre rutas y entre módulos de acción. Los datos que provienen de escrutinios masivos de interacciones genéticas (p. ej. **E-MAP**, **SGA**) pueden integrarse para predecir funciones celulares e interacciones gen-gen, gen-proteína y proteína-proteína desconocidas. La aplicación de esta estrategia en este estudio ([Figura 17 ver, Resultados Apartado I; Tabla S11 y Figura S1 ver, Material Suplementario](#)) reveló múltiples características en la red de nuestro escrutinio, entre las cuales destacamos tres como ejemplo.

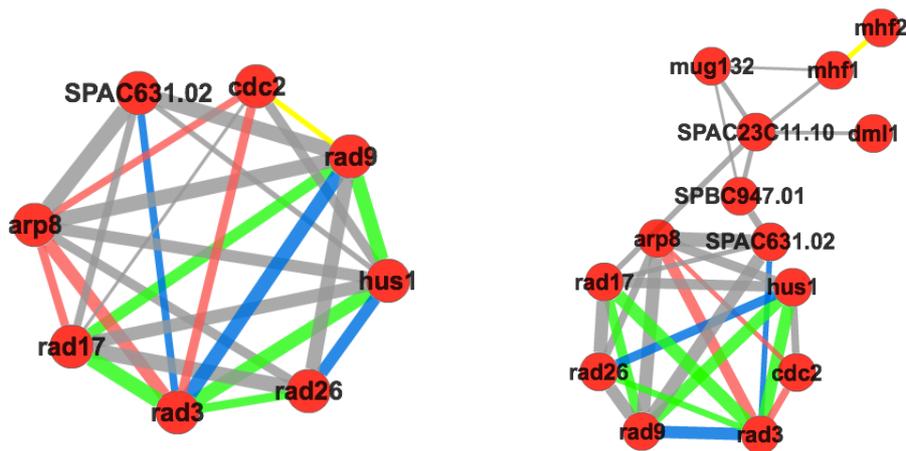
**En la primera**, se observa como el módulo de los genes asociados a replicación (*rad9/hus1/rad26/rad3/rad17*) interactúa entre sí y conecta con *cdc2<sup>+</sup>* a través de *rad9<sup>+</sup>* o *rad3<sup>+</sup>* (Figura 2 ver, Discusión Apartado I). Este hecho sugiere que un proceso biológico común (p. ej. replicación), es soportado por la actividad de estas proteínas y la actividad de la CDK, de acuerdo a lo descrito por al-Khodairy y Carr, 1992; Walworth *et al.*, 1993 y Rhind y Russell, 1998.

**En la segunda**, se observa una relación funcional entre *arp8<sup>+</sup>* y *SPAC631.02* (Figura 1, ver Discusión Apartado I), dos genes cuyos productos están asociadas al remodelamiento de la cromatina (Hogan *et al.*, 2010; Garabedian *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). De igual manera, estos dos genes extienden su relación hacia el módulo de acción de los genes *mhf1<sup>+</sup>* y *mhf2<sup>+</sup>* (Figura 1 ver, Discusión Apartado I), cuyas proteínas participan en la reparación del daño en el ADN en *S. pombe* (Bhattacharjee *et al.*, 2013) y en la segregación cromosómica según sus ortólogos humanos CENP-S y CENP-X (Amano *et al.*, 2009). A su vez, en esta última relación, sirven como puente cuatro genes (Figura 1 ver, Discusión Apartado I), cuyas funciones aún no han sido caracterizadas en *S. pombe* (*SPBC947.01*, *SPAC23C11.10*, *dml1<sup>+</sup>* y *mug132<sup>+</sup>*). Estas relaciones funcionales, sugieren que bien estas proteínas desempeñan múltiples funciones asociadas al remodelamiento de cromatina, segregación cromosómica y reparación del ADN, o que sus funciones se relacionan con los tres procesos celulares a través de elementos comunes a estas (por ej. estructura y función de nucleosomas). Esta predicción puede apoyarse en parte por el fenotipo de células largas y retraso en citoquinesis y/o replicación observado en los mutantes *SPBC947.01Δ* y *SPAC23C11.10Δ*, a través de nuestra caracterización comprensiva.

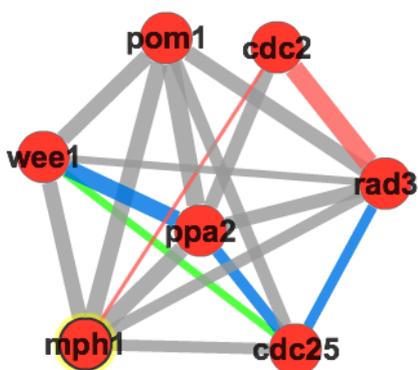
**En la tercera**, se observa la interacción de *cdc2* con reguladores del ciclo celular (Figura 2 ver, Discusión Apartado I). Para la mayoría de estos genes, su función biológica y los mecanismos moleculares de su regulación han sido descritos. Tanto la subunidad reguladora de la fosfatasa tipo 2A (PP2A) codificada por el gen *ppa2<sup>+</sup>*, como la proteína quinasa codificada por el gen *pom1* han sido descritas como reguladores negativos de la entrada a mitosis en *S. pombe*. (Martin y Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley *et al.*, 2009; Kinoshita *et al.*, 1993). En el caso de Pom1, el mecanismo molecular está definido, ya que regula la actividad de Wee1, sin embargo en el caso de Ppa2 el mecanismo es aún impreciso, ya que la regulación directa de esta sobre Cdc2 aun no ha sido demostrada (Kinoshita *et al.*, 1993). La relación funcional entre los genes *ppa2<sup>+</sup>* con *rad3<sup>+</sup>* y *mph1<sup>+</sup>*,

## Discusión

también sugiere un papel de la proteína fosfatasa en el control de la replicación del ADN (Jimenez *et al.*, 1992; Seaton *et al.*, 1992) y el control del ensamblaje del huso mitótico (He *et al.*, 1998) respectivamente. Ppa2 podría regular la actividad de Cdc2 no sólo a la entrada de mitosis sino a lo largo de todo el ciclo mitótico en *S. pombe*, actuando como un regulador clave en las capas secundarias que conectan con el sistema Wee1-Cdc2-Cdc25. Las anteriores reflexiones le hacen un elemento interesante para abordar.



**Figura 1.** Módulo de interacción entre los mutantes *rad* y otros genes asociados a replicación y remodelamiento de cromatina. Estas imágenes han sido tomadas desde la web de los autores (<http://www.bahlerlab.info/>). Nota: El gen *SPAC631.02* actualmente se encuentra anotado en Pombase como *bdf2* (proteína de remodelamiento de cromatina-función descrita), *SPBC947.01* como *alf1* (proteína asociada a microtúbulos- función predicha) y *SPAC23C11.10* como *mpn1* (proteína de procesamiento de mARN-función predicha).



**Figura 2.** Módulo de interacción entre el gen *ppa2* y los genes que controlan la entrada a mitosis como *wee1*, *cdc25* y *cdc2*. Esta imagen ha sido modificada de su original obtenida desde la web de los autores (<http://www.bahlerlab.info/>).

## Discusión

Por último, basados en estas interpretaciones es posible argumentar que las interacciones negativas observadas con *wee1-50* o *cdc2-3w*, se deben mas a una descompensación en la actividad de grupos de genes, que a la ausencia de un gen en particular. De ahí que la esencialidad de estos genes no dependa de su función individual sino de su participación conjunta en un determinado proceso celular (redundancia funcional).

Siguiendo este ejemplo, análisis de este tipo merecen ser empleados para entender y visualizar el significado de las relaciones funcionales entre la maquinaria de regulación de entrada a mitosis y los genes identificados en el escrutinio, junto con evidencias experimentales que apoyen dichas predicciones.

### APARTADO II

#### 1. Ppk18 (*Greatwall*) e Igo1 (*Ensa*) actúan como reguladores positivos de la entrada a mitosis en *S. pombe*

Los complejos Cdk-ciclina controlan el ciclo celular eucariótico y en el caso de *S. pombe* una única Cdk, llamada Cdc2, es suficiente para regularlo. Los niveles de la Cdk varían a lo largo del ciclo celular y a su vez confiere direccionalidad a los eventos que lo componen. Uno de los sistemas de control más estudiado en este modelo, comprende la regulación de la actividad del complejo Cdc2-Cdc13 durante la transición G2/M. Dicha actividad se mantiene levemente reprimida desde la transición G1/S hasta mediados de la fase G2, mediante fosforilación de la Cdc2 en la Y15 por parte de las quinasas Mik1 y Wee1. Cerca de la transición G2/M, esta actividad se dispara hasta niveles máximos a través de dos mecanismos moleculares: **i)** desfosforilación de Cdc2 en el residuo Y15 a cargo de la fosfatasa Cdc25 y **ii)** autoamplificación de la activación a través de un mecanismo de retroalimentación positivo, propio de la Cdk, que potencia la activación de Cdc25 y la inhibición de Wee1. La integración de datos obtenidos en los últimos cinco años, a partir del estudio de nuevos elementos que incluyen la proteína fosfatasa tipo 2A (PP2A) y las proteínas *Greatwall* y Arrp19 y Ensa, en diferentes modelos biológicos como *S. cerevisiae*, *Xenopus*, *Drosophila* y mamíferos han generado una nueva perspectiva de como las células coordinan y regulan esta transición.

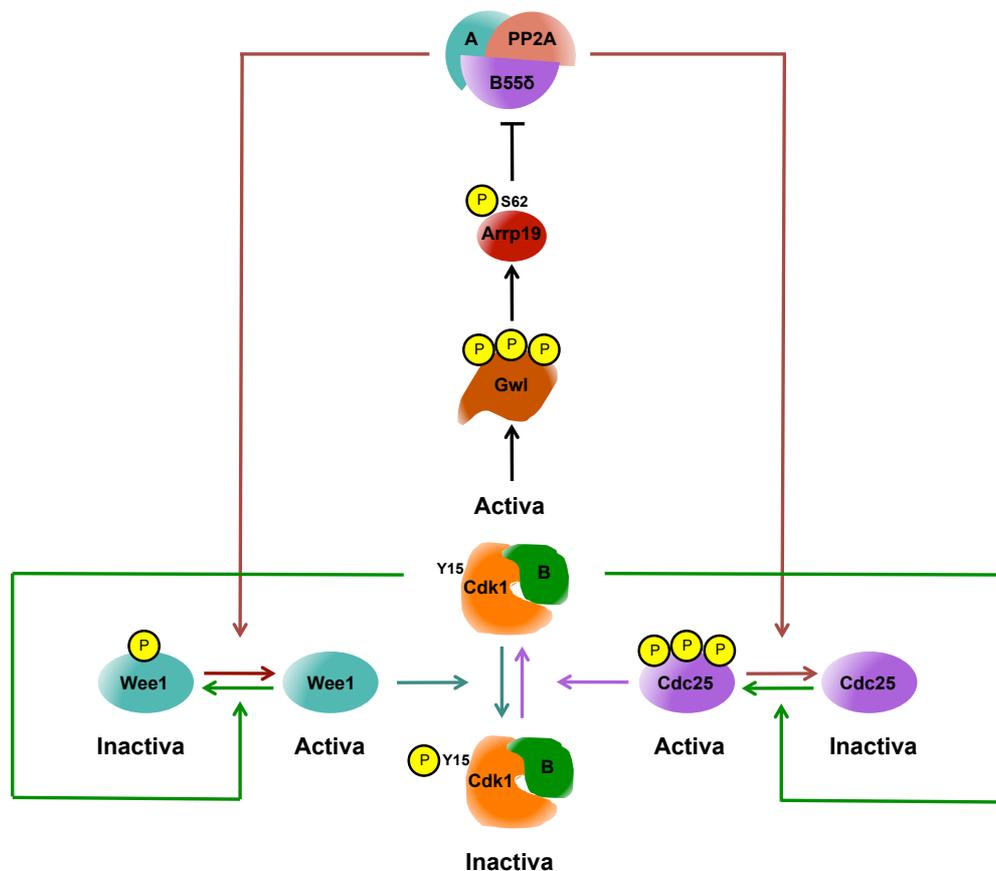
En 2009, Mochida *et al.*, y Vigneron *et al.*, identificaron a la proteína fosfatasa PP2A unida a la subunidad B55δ, como un componente molecular necesario para regular la entrada a mitosis y salida desde ésta en *Xenopus*. Según los primeros autores, esta fosfatasa se encarga de desfosforilar proteínas en mitosis, previamente fosforiladas por la CDK en la transición G2/M o en profase, ya que la depleción de PP2A-B55δ acelera la entrada a mitosis y retrasa la salida en extractos de oocitos. Los segundos autores, propusieron que la actividad de PP2A es inhibida por la quinasa *Greatwall* (MAST-L en humanos) con el fin de asegurar la actividad del complejo Cdc2-ciclina B y del mecanismo de retroalimentación positivo.

En *S. pombe* se han identificado dos subunidades catalíticas del complejo PP2A: *ppa2<sup>+</sup>* y *ppa1<sup>+</sup>* (Kinoshita *et al*, 1990). Nuestras observaciones sobre los mutantes de

delección de ambos genes han demostrado que la actividad del complejo PP2A en *S. pombe*, también regula negativamente la entrada a mitosis, ya que ambos mutantes presentan células más pequeñas que la cepa silvestre, aunque en mayor medida en el caso del mutante *ppa2Δ*. Este resultado implica que en este contexto, la subunidad Ppa1 cumple un papel secundario frente a Ppa2. Los resultados de los análisis epistáticos realizados con el mutante *ppa2Δ* y los mutantes de ciclo *wee1-50* y *cdc25-22*, sugieren que en la levadura de fisión, los complejos PP2A regulan positivamente la actividad de Wee1 y negativamente la actividad de Cdc25. La pérdida de viabilidad que provoca la ausencia de *ppa2<sup>+</sup>* al mutante *wee1-50* junto con la supresión parcial al fenotipo de incremento de la longitud celular del mutante *ts cdc25-22* fueron previamente reportados por Kinoshita *et al.*, 1990. Navarro y Nurse, 2012 también han identificado a Ppa2 como un gen regulador de la transición G2/M. Sin embargo, hasta ahora sobre el papel de Ppa2 en la entrada a mitosis no se ha profundizado más allá de estos resultados genéticos en la levadura de fisión.

La quinasa *Greatwall* es un regulador negativo de la actividad del complejo PP2A-B55δ en la transición G2/M (Castilho *et al.*, 2009), como consecuencia de la actividad de dos proteínas Ensa y Arrp19 (Mochida *et al.*, 2010 y Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010). Un papel *in vivo* solo ha sido demostrado para Arrp19 (Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010). Los resultados presentados en este trabajo identifican a Igo1, como el ortólogo de estas proteínas. Igo1 no es esencial, pero su delección es suficiente para generar células ligeramente más largas que el silvestre, contrario a lo observado en células que carecen de Ppa2. El mutante *igo1Δ* es capaz de suprimir el fenotipo de *wee1-50* al igual que incrementar el fenotipo de pérdida de viabilidad, por bloqueo en la fase G2 del mutante *cdc25-22*, de forma opuesta a la ausencia de *ppa2<sup>+</sup>*. Asimismo, hemos identificado a la quinasa Ppk18 como el ortólogo de *Greatwall* (ver más adelante). La delección de Ppk18 genera células largas como el mutante *igo1Δ*, indicando que también actúa como un regulador de entrada a mitosis. Estos resultados, nos permiten proponer a Igo1 y a Ppk18 como dos nuevos reguladores positivos de la transición G2/M en *S. pombe*. Estos resultados coincide con el modelo biológico que propone que la ruta Gwl-Ensa favorece la actividad de la Cdk en la entrada a mitosis por contrarrestar la actividad de la fosfatasa PP2A-B55δ en *Xenopus* (Figura 1 ver, Discusión Apartado II) y en humanos (Voets y Wolthuis, 2010).

## Discusión



**Figura 1.** La ruta Greatwall-Ensa-PP2A-B55 $\delta$  induce entrada a mitosis en *Xenopus*. El complejo PP2A-B55 $\delta$  mantiene los oocitos de *Xenopus* en interfase mediante la activación de Wee1 y la inactivación de Cdc25. Para que las células progresen a mitosis, la CDK, como parte del mecanismo de retroalimentación positivo, activa a *Greatwall*, que a su vez fosforila a Arrp19 en la S62 (también a Ensa *in vitro*). Arrp19 activa inhibe al heterotrímero PP2A-B55 $\delta$  con el fin de favorecer la actividad del complejo Cdk1-ciclina B y la fosforilación de sus sustratos Wee1 (forma inactiva) y Cdc25 (forma activa). (Mochida *et al.*, 2009; Vigneron

## 2. La ruta Greatwall-Ensa-PP2A coordina la entrada a mitosis como respuesta a estrés nutricional en *S. pombe*

El hecho de que los ortólogos de *Greatwall* y *Ensa* no sean esenciales en *S. pombe* contrario a lo visto en células animales, sugiere que la entrada a mitosis en este organismo está regulada por diferentes mecanismos moleculares, donde unos pueden llegar a ser más relevantes que otros en determinadas condiciones fisiológicas. En este trabajo hemos demostrado que la ruta Gwl-Ensa está conservada en *S. pombe* y que su función se hace más relevante a medida que se limitan los nutrientes. Los resultados discutidos a continuación junto con los anteriores sugieren que esta ruta es importante para

para dirigir la entrada a mitosis a través de la inhibición de la fosfatasa PP2A-B55δ, como respuesta a un estrés nutricional.

En el mutante *igo1Δ*, el fenotipo de retraso de la fase G2 se acentúa bajo estrés por nitrógeno, lo cual puede explicar la incapacidad del mutante de acumular población en fase G1 cuando crece en una fuente pobre en nitrógeno (fenilalanina). Realizando un seguimiento *in vivo* de la entrada a mitosis hemos demostrado que Igo1 induce la entrada a mitosis en situaciones donde la calidad de nitrógeno empeora rápidamente. En ausencia de nitrógeno las células mutantes reducen su tamaño (aunque no hasta niveles silvestres) y no se bloquean en fase G1 con la misma eficiencia que una cepa silvestre. Estas observaciones, aparentemente contradictorias, pueden sugerir o i) que las células de *S. pombe* tienen mecanismos adicionales para dirigir la entrada a mitosis en respuesta a la carencia de nutrientes (Petersen y Nurse, 2007) y/o ii) o que las células mutantes no tienen tiempo de acumular biomasa (sólo dos rondas de división) del mismo modo a como la acumulan en una situación donde las divisiones mitóticas son sucesivas. Por tanto, en la primera situación Igo1 induce la entrada a mitosis y mantiene una proliferación continua a un tamaño celular reducido y en la segunda Igo1 es al menos, una de las vías empleadas por la célula para salir del ciclo mitótico.

La eliminación de la quinasa Rad3 (ATR en mamíferos) a células que carecen de Igo1 permitió descartar que el retraso en la fase G2 fuera una consecuencia de la activación del *checkpoint* de daño al ADN o de una activación de Rad3 asociada a estrés nutricional, la cual aún no ha sido reportado (Irrazabal *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2003). A una conclusión similar llegaron los autores que identificaron por primera vez a *Greatwall*, tras demostrar que el fenotipo de cromosomas descondensados de los mutantes *Gwl* no era el resultado de la activación del *checkpoint* de replicación sino de la falta de activación de la condensina por parte del complejo Cdk-ciclina (Yu *et al.*, 2004). Por otro lado, el retraso en la fase G2 de *igo1Δ* fue suprimido por el mutante *cdc2-3w*, indicando que la actividad de Cdc25 está por debajo de la actividad de Igo1. Un efecto similar fue descrito por Yu *et al.*, 2006, al observar que una Cdk1 constitutivamente activa era capaz de suprimir el defecto de entrada a mitosis en ausencia de *Greatwall*. En la línea de estos resultados, Zhao *et al.*, 2008 demostraron que la actividad de *Greatwall* regula la fosforilación de Cdc25, lo cual también fue sugerido por Vigneron *et al.*, 2009 y Casthilo *et al.*, 2009. En este caso, proponemos que Igo1 requiere de la activación de Cdc25 para inducir la entrada a mitosis bajo estrés por nitrógeno.

## Discusión

Mediante un análisis de homología, identificamos a Ppk18 y Cek1 como posibles ortólogos de *Greatwall*. Hasta ahora a Ppk18 no se la había atribuido ninguna función asociada al ciclo celular (Bimbó *et al.*, 2005), mientras que Cek1 se había relacionado con la progresión de NETO, el cambio de crecimiento monopolar a bipolar que ocurre en la fase G2 (Koyano *et al.*, 2010) y la progresión metafase-anafase (Samejima y Yanagida, 1994). Individualmente, la delección de *ppk18*<sup>+</sup> genera células largas, pero la de *cek1*<sup>+</sup> no. No obstante, la doble delección genera células tan largas como las de *igo1Δ* en fenilalanina, ya que la penetrancia del fenotipo de *ppk18Δ* es menor. El fenotipo del doble mutante *ppk18Δ igo1Δ* demuestra que Igo1 actúa por debajo de Ppk18. La proteína Igo1 tiene conservado el sitio de fosforilación por *Greatwall* (S64) y con el análisis del mutante fosfonulo S64A hemos confirmado, tal como se ha observado en *Xenopus*, que su actividad depende en parte de este sitio de fosforilación S64 (Ser) y asimismo, que la fosforilación del mismo depende de Ppk18, y no de Cek1 aparentemente. Arrp19 y Ensa también son fosforilados *in vitro* por la proteína quinasa A PKA (S109) y por Cdk2 (T28 y S28 en Ensa y Arrp19 respectivamente) (Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010; Mochida *et al.*, 2010). Igo1 tiene conservado el sitio de fosforilación por Cdk y otro potencial (S102), sin embargo los mutantes fosfonulos de estos sitios por separado no generan ningún fenotipo en el tamaño celular. Sería interesante probar si la combinación de ambos genera alguna pérdida de funcionalidad, ya que se ha propuesto que al menos *Greatwall* requiere de la Cdk para su activación (Yu *et al.*, 2006; Vigneron *et al.*, 2011). Recientemente en *Xenopus*, se ha reportado que la fosforilación combinada de Ensa en los sitios Cdk y *Greatwall* y PKA y *Greatwall* podría dirigir una modulación gradual de la actividad de PP2A-B55δ (Mochida *et al.*, 2013). Esto es interesante, puesto que la activación de la ruta Ppk18-Igo1 bajo estrés nutricional también podría estar regulada de esta manera (ver más adelante). Al sobreexpresar a Ppk18, se observó una reducción del tamaño celular, lo cual apoya la idea de que Ppk18 induce la entrada a mitosis. A tiempos largos, dicha sobreexpresión causó el cese del crecimiento celular, sin embargo el bloqueo no ocurrió en la fase G1, lo que indica que estas células al crecer en condiciones ricas en nutrientes (glutamato) son capaces de pasar el *start* y bloquearse en G2 durante su último ciclo. Los tiempos largos de sobreexpresión, inducen en las células pérdida de polaridad y acumulación de dobletes, sugiriendo que para favorecer la actividad del complejo PP2A-pab1 en la regulación de la morfogénesis y la citoquinesis (Lahoz *et al.*, 2010; Bernal *et al.*, 2012) se requiere posiblemente de la inactivación de Ppk18.

Por otro lado, con un análisis epistático hemos mostrado que el retraso en la fase G2

del mutante *igo1Δ* es dependiente de la actividad de Ppa2 y Pab1, lo cual sugiere que Igo1 probablemente inhibe la actividad de este complejo al igual que en *Xenopus*, donde se ha demostrado que las proteínas Arrp19 y Ensa promueven la entrada a mitosis a oocitos en interfase (Gharbi-Ayachi *et al.*, 2010 y Mochida *et al.*, 2010) mediante la interacción física entre la subunidad B55δ y la subunidad C, y la consecuente inhibición de su sitio catalítico (Mochida, 2013). En *S. cerevisiae*, Igo1/Igo2 interactúan genéticamente y físicamente con Cdc55 (el homólogo de las isoformas de B55δ), lo cual ha sido demostrado en diferentes contextos biológicos (Talarek *et al.*, 2010; Bontron *et al.*, 2013; Juanes *et al.*, 2013).

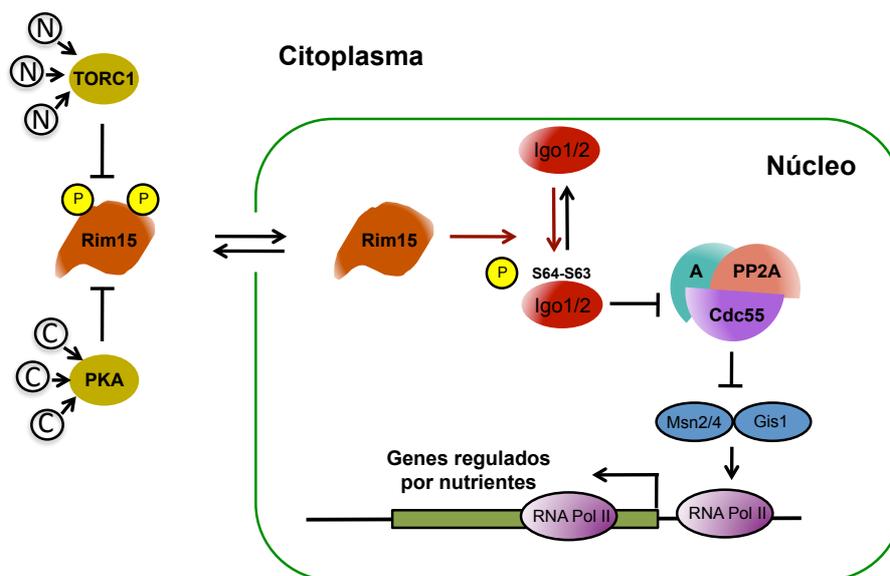
### 3. TORC1 (Tor2) y la proteína quinasa A (PKA) regulan negativamente la actividad de la ruta Greatwall-Ensa en *S. pombe*

Las proteínas TORC1 y PKA son elementos que controlan el crecimiento celular en respuesta a nutrientes en levaduras. En *S. cerevisiae* la inactivación de TORC1 o PKA detienen el crecimiento celular y las células bloquean el ciclo celular en la fase G1 y posteriormente entran en estado de quiescencia (G0). Los mecanismos que controlan esta entrada a quiescencia involucran a Rim15, el ortólogo de *Greatwall* en este organismo. La activación de Rim15 requiere de su acumulación en el núcleo. TORC1 a través de Sch9 (Sck1 y Sck2 en *S.pombe*) y el complejo Pho80-85 fosforilan a Rim15 en la S1061 y la T1075 respectivamente (Pedruzzi *et al.*, 2003; Wanke *et al.*, 2005) para promover su exporte hacia el citoplasma, donde PKA la mantiene secuestrada (Reinders *et al.*, 1998; Pedruzzi *et al.*, 2003). La función principal de Rim15 es regular la entrada a quiescencia y prolongar la esperanza de vida tras este estado, a través de la inactivación de PP2A-Cdc55 vía Igo1/Igo2. En este contexto PP2A-Cdc55 reprime la expresión de genes relacionados con estrés nutricional por inactivación de los factores de transcripción Gis1 y Msn2/4 (Bontron *et al.*, 2013). Por otro lado se ha descrito que en las células de la levadura de fisión, la proteína PKA regula negativamente la entrada mitosis a través de Cdc25. Lo que sugiere que dicho evento podría ser a través de la actividad de Igo1 (Kishimoto y Yamashita, 2000).

De acuerdo con nuestros resultados, los niveles de Igo1 y la fosforilación en la S64 dependen de una señalización nutricional. Dicha señalización es regulada por TORC1 (Tor2) y PKA, ya que los análisis genéticos entre los mutantes *tor2-51*, *pka1Δ* e *igo1Δ*

## Discusión

demuestran que Igo1 actúa por debajo de TORC1 (Tor2) y de PKA. El descenso en la actividad del complejo TORC1 (Tor2) por el cambio nutricional desde una fuente rica en nitrógeno (glutamato) a una pobre (fenilalanina) induce la fosforilación de Igo1 en la S64. De igual manera, la reducción en la concentración de glucosa induce también dicha fosforilación. Así, proponemos que la actividad de Igo1 es regulada negativamente por el complejo TORC1 (Tor2) y la proteína quinasa A (PKA) en *S. pombe* al igual que ocurre en *S. cerevisiae*.



**Figura 2. Ruta *Greatwall*-Ensa induce y mantiene la quiescencia en *S. cerevisiae*.** En células creciendo exponencialmente, Rim15 (*Greatwall*) se mantiene excluido del núcleo mediante fosforilaciones inhibitorias por parte del complejo TORC1 y la proteína quinasa A. Cuando las células detectan una reducción de nutrientes se inactivan TORC1 y PKA. Rim15 entra al núcleo y fosforila a las proteínas Igo1 e Igo2 en la S64 y S63 respectivamente. Igo1/Igo2 activas inhiben al complejo PP2A-Cdc55 para inducir la transcripción de genes regulados por nutrientes por parte de los factores Msn2/4 y Gis1. Igo1/Igo2 también se encargan de proteger de la degradación a los mRNAs de estos genes (Talarek *et al.*, 2010; Bontron *et al.*, 2013). Este programa transcripcional es importante para mantener la viabilidad de las células en G0.

Teniendo en cuenta que la fosforilación de Igo1 es dependiente de Ppk18, nosotros defendemos la idea de que el complejo TORC1 y la proteína PKA regulan negativamente la actividad del módulo Ppk18-Igo1. En *S. cerevisiae*, se ha propuesto que TORC1 podría activar selectivamente a la proteína PKA para dirigir su actividad quinasa sobre ciertos sustratos. Según Shabb, 2001 y Budovskaya *et al.*, 2005, el sitio consenso de fosforilación dependiente de TORC1, es RRxS. Sería importante determinar si estos si estos sitios están presentes en Ppk18, y asimismo si la S1061 de Rim15 se encuentra se

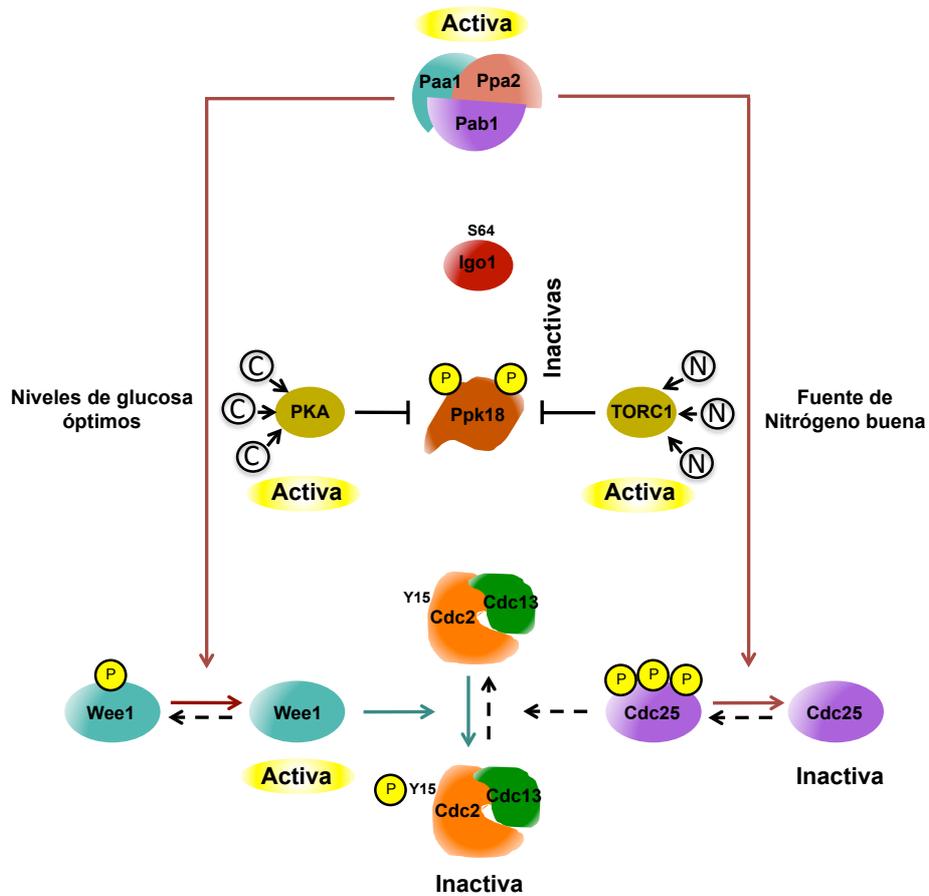
conservada. Como se mencionó anteriormente, Igo1 posee un sitio PKA (S128) cercano al de sus ortólogos Ensa y Arrp19 (S109). Una posibilidad a tener en cuenta es que TORC1 y/o PKA podrían fosforilar tanto a Ppk18 como a Igo1 para potenciar la inhibición de la ruta. Sin embargo, en este caso la regulación por PKA en nuestro modelo sería negativa, contrario a lo propuesto para Ensa (Mochida, 2013). El hecho de que en *S. cerevisiae*, la ruta Greatwall-Ensa dirija la entrada a quiescencia, sugiere que en *S. pombe* también pueda ocurrir a través de esta vía, ya que se ha visto que las quinasas Cek1 y Ppk18 se requieren para extender la esperanza de vida tras la quiescencia (CLS, del inglés *Chronological LifeSpan*) (Chen *et al.*, 2013).

En otro contexto de *S. cerevisiae*, contrario al modelo de *Xenopus*, se asume que el papel de la fosfatasa PP2A-Cdc55 (ortólogo de PP2A-B55δ) consiste en promover la entrada a mitosis y prevenir la salida (Jiang, 2006). Esto es así, porque PP2A-Cdc55 desfosforila e inhibe a Swe1 (el ortólogo de Wee1) (Yang *et al.*, 2000) y a su vez desfosforila y activa a Mih1 (el ortólogo de Cdc25) (Pal *et al.*, 2008), en sentido contrario a lo descrito para las células animales y las de *S. pombe*. Teniendo en cuenta estas diferencias mecánicas, se ha propuesto que Igo1 e Igo2, previamente activados por Rim15, actúan como reguladores positivos de la actividad de PP2A-Cdc55 y de la entrada a mitosis (Juanes *et al.*, 2013). Sin embargo, estos autores no relacionan la localización y activación de Rim15 dependiente de TORC1 y PKA en este contexto. En *S. pombe*, se ha propuesto diferentes mecanismos que coordinan la entrada a mitosis con el ambiente nutricional, incluyendo la ruta Pom1-Cdr1-Wee1 (Martin y Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley *et al.*, 2009) y la ruta Tor1-Sty-Plo1-Cdc25 (Petersen y Hagan, 2005; Petersen y Nurse, 2009). Nuestros resultados, demuestran que la ruta *Greatwall*-ENSA es un sensor nutricional que actúa independientemente de ambas rutas, ya que los dobles mutantes entre *igo1Δ* y *sty1Δ* o *igo1Δ* y *cdr1Δ* muestran fenotipos aditivos.

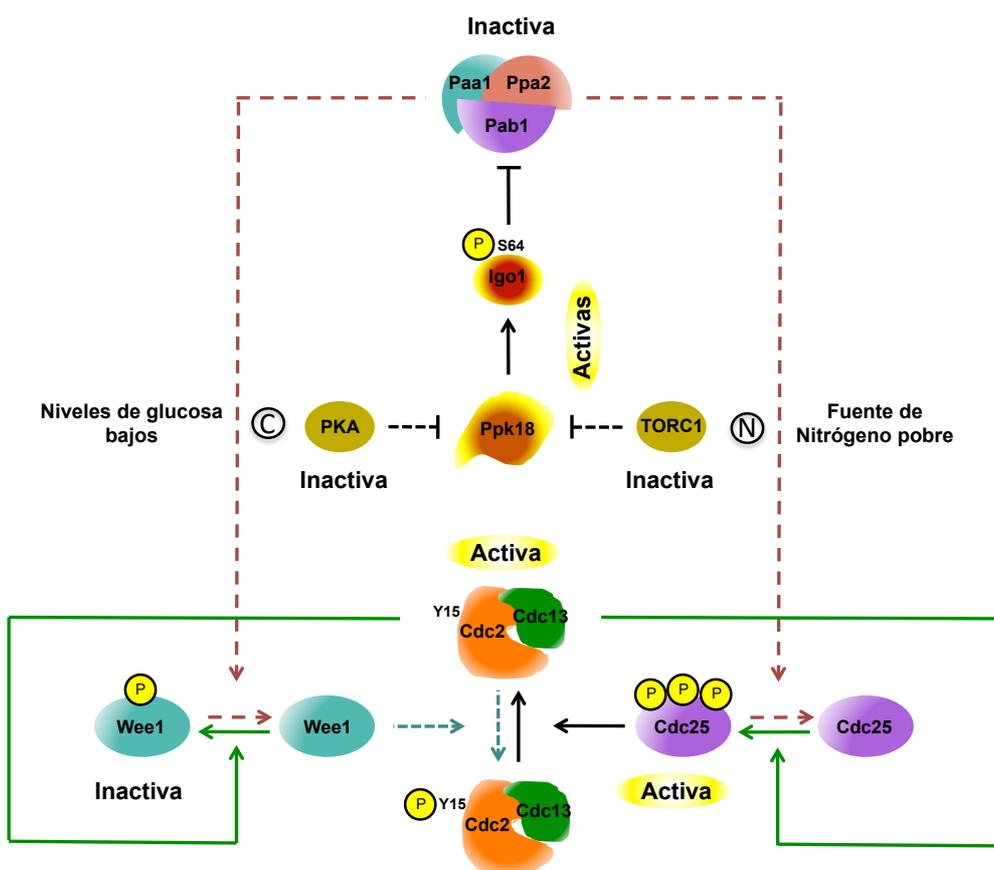
## 4. Modelo biológico

Proponemos un modelo por el cual el papel fisiológico de la ruta *Greatwall*-Ensa-Ppa2-Pab1 en *S. pombe* es regular la entrada a mitosis en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (Figuras 3 y 4 ver, [Discusión Apartado II](#)). Asimismo, nuestro modelo unifica los mecanismos moleculares que gobiernan la funcionalidad de este módulo tanto en células animales como en *S. cerevisiae*. Por otro lado, destaca la adaptación de la ruta *Greatwall*-Ensa a la biología celular de cada organismo a lo largo de la evolución.

## Discusión



**Figura 3. Entrada a mitosis sin estrés nutricional en *S. pombe*.** Cuando las células crecen en una fuente de nitrógeno **buena** y niveles de glucosa **óptimos**, el complejo TORC1 (Tor2) y la proteína quinasa A (PKA) mantienen apagada la ruta *Greatwall*-Ensa, probablemente mediante la fosforilación de Ppk18 (Gwl). En G2, el complejo PP2A-Pab1 inhibe la activación de Cdc2 al desfosforilar a Cdc25 (inactivo) y a Wee1 (activo). La entrada a mitosis ocurre por mecanismos independientes a Ppk18 e Igo1.



**Figura 4. Entrada a mitosis bajo estrés nutricional en *S. pombe*.** Cuando se produce una reducción en los niveles de nitrógeno o la fuente de glucosa, el complejo TORC1 (Tor2) y la proteína quinasa A (PKA) se inactivan. A continuación Ppk18 (Gwl) se activa y a su vez activa a Igo1 (Ensa) mediante fosforilación en la S64. Igo1 inhibe al complejo PP2A-Pab1 y favorece la inactivación de Wee1 y la activación de Cdc25. El sistema de retroalimentación positiva del complejo Cdc2-Cdc13 se potencia. Finalmente las células entran a mitosis como respuesta al cambio nutricional. Si el descenso en los nutrientes no es completamente limitante, las células proliferan con un tamaño celular reducido, de lo contrario se bloquean en la fase G1.

## Discusión

En el sistema antagónico Cdc2-PP2A, la ruta *Greatwall*-Ensa sería la responsable de empujar la balanza hacia el lado de la quinasa y favorecer la entrada a mitosis en un contexto de respuesta a limitación de nutrientes. Así, en células creciendo bajo condiciones nutricionales óptimas, el complejo TORC1 (Tor2) y la proteína PKA mantienen inhibida la ruta *Greatwall*-Ensa, probablemente mediante fosforilación de Ppk18 (Figura 3 ver, Discusión Apartado II); y cuando las células detectan condiciones pobres en nutrientes, la inhibición de TORC1 y PKA desencadena la activación de la ruta *Greatwall*-Ensa y la consecuente inhibición del complejo PP2A-Pab1. Dicha inhibición contribuye a la actividad del complejo Cdc2-Cdc13 y la fosforilación de sus sustratos, tales como Wee1 y Cdc25, lo cual a su vez induce la entrada acelerada en mitosis como respuesta al estrés nutricional (Figura 4 ver, Discusión Apartado II). De esta manera, esta señalización se integra en el mecanismo amplificador del sistema de retroalimentación positiva de la Cdk en *S. pombe* (Boke y Hagan, 2011).

Todos los resultados presentados en esta memoria, aportan una nueva visión sobre los mecanismos moleculares que controlan la ruta *Greatwall*-Ensa-PP2A, que no necesariamente tienen por qué estar ausentes en eucariotas superiores.

# Conclusiones

## Conclusiones

1. Sólo el 9% de los genes no esenciales de *S. pombe*, manifestaron algún tipo de interacción genética con *wee1-50* y *cdc2-3w*, sugiriendo que la regulación del ciclo celular depende de mecanismos específicos.
2. La mayoría de las interacciones genéticas identificadas fueron débiles, indicando que existe redundancia funcional en la regulación del ciclo celular que podrían compensar la pérdida de viabilidad.
3. La redes de interacción identificadas en este análisis sugieren que en las células de *S. pombe* existe una coordinación entre la maquinaria del ciclo celular, la replicación del ADN, la segregación cromosómica, la citoquinesis y rutas de señalización que controlan tamaño, estrés, etc.
4. El análisis genético realizado entre los genes identificados en el escrutinio de sintéticos letales es una herramienta útil para predecir nuevas funciones y entender el significado de sus interacciones con *wee1-50* y *cdc2-3w*.
5. La ruta *Greatwall*-Ensa-PP2A-Pab1 coordina la entrada a mitosis con el ambiente nutricional del medio de cultivo en *S. pombe*. En medios ricos PPA2-Pab1 está activa, retrasa la entrada en mitosis y las células son mas largas, mientras que en medios pobres se activa *Greatwall* y Ensa inhibe a PP2A-Pab1 produciéndose una aceleración de la entrada en mitosis y un acortamiento del tamaño celular.
6. La ruta *Greatwall*-Ensa está regulada negativamente por la actividad del complejo TORC1 (Tor2) y la proteína quinasa A (PKA) en células de *S. pombe*.
7. La ruta *Greatwall*-Ensa-PP2A-Pab1 es parte del mecanismo del sistema de amplificación positivo del complejo Cdc2-Cdc13 que regula la entrada en mitosis.

# Material Suplementario



Tabla S1. Genes que interactúan genéticamente con *wee1-50* a 35°C

Sintético letal/enfermo	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Sintético letal/enfermo	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)
1	SPBC216.05	<i>rad3</i>	-4	111	SPAC17A5.02c	<i>dbr1</i>	-2
2	SPBPB2B2.01	SPBPB2B2.01	-4	112	SPBC354.12	<i>gpd3</i>	-2
3	SPAC19B12.10	<i>sst2</i>	-4	113	SPBC1198.11c	<i>reb1</i>	-2
4	SPAC14C4.13	<i>rad17</i>	-4	114	SPAC1834.05	<i>alg9</i>	-2
5	SPAC9E9.08	<i>rad26</i>	-4	115	SPAC212.08c	SPAC212.08c	-2
6	SPAC11G7.06c	<i>mug132</i>	-4	116	SPCC569.02c	SPCC569.02c	-2
7	SPBC36.06c	<i>spo9</i>	-4	117	SPCC825.05c	SPCC825.05c	-2
8	SPAPB1A10.09	<i>ase1</i>	-4	118	SPAC23C11.10	<i>mpn1</i>	-2
9	SPBC23G7.08c	<i>rga7</i>	-3	119	SPAC5D6.13	SPAC5D6.13	-1
10	SPAC20G4.04c	<i>hus1</i>	-3	120	SPCC285.15c	<i>rps2802</i>	-1
11	SPAC1952.07	<i>rad1</i>	-3	121	SPAC823.05c	<i>tlg2</i>	-1
12	SPAC664.07c	<i>rad9</i>	-3	122	SPBC3H7.07c	<i>ser2</i>	-1
13	SPAC13A11.01c	<i>rga8</i>	-3	123	SPAC31A2.02	<i>trm112</i>	-1
14	SPAC6F6.01	<i>cch1</i>	-3	124	SPBC56F2.10c	<i>alg5</i>	-1
15	SPBC660.14	<i>mik1</i>	-3	125	SPAC1D4.11c	<i>lkh1</i>	-1
16	SPCC1223.15c	<i>spc19</i>	-3	126	SPBC342.01c	<i>alg6</i>	-1
17	SPBC215.02	<i>bob1</i>	-3	127	SPAC1486.04c	<i>alm1</i>	-1
18	SPAC2F7.03c	<i>pom1</i>	-3	128	SPBC336.03	<i>efc25</i>	-1
19	SPBC32F12.05c	<i>cwf12</i>	-3	129	SPBC342.05	<i>crb2</i>	-1
20	SPAC631.02	<i>bdf2</i>	-3	130	SPAC4G8.05	<i>ppk14</i>	-1
21	SPBC947.01	<i>alf1</i>	-3	131	SPBC1685.01	<i>pmp1</i>	-1
22	SPBC2D10.16	<i>mhf1</i>	-3	132	SPBC15C4.01c	<i>oca3</i>	-1
23	SPAC31G5.18c	<i>sde2</i>	-3	133	SPAC3H5.12c	<i>rpl501</i>	-1
24	SPAC1782.05	<i>ypa2</i>	-3	134	SPBC776.17	SPBC776.17	-1
25	SPAC30C2.06c	<i>dml1</i>	-3	135	SPCC1494.08c	SPCC1494.08c	-1
26	SPBC16H5.07c	<i>ppa2</i>	-3	136	SPAC10F6.08c	SPAC10F6.08c	-1
27	SPAC23D3.09	<i>arp42</i>	-3	137	SPAC140.02	<i>gar2</i>	-1
28	SPAC18G6.15	<i>mal3</i>	-3	138	SPAC4F8.01	<i>did4</i>	-1
29	SPAC212.03	SPAC212.03	-3	139	SPCC794.11c	SPCC794.11c	-1
30	SPBC106.01	<i>mph1</i>	-3	140	SPAC3H1.11	<i>hsr1</i>	-1
31	SPAC3A11.13	SPAC3A11.13	-3	141	SPAPB1E7.06c	<i>eme1</i>	-1
32	SPAC3H8.07c	<i>pac10</i>	-3	142	SPBC354.10	<i>def1</i>	-1
33	SPAC2F3.02	SPAC2F3.02	-3	143	SPCC594.01	SPCC594.01	-1
34	SPBC11C11.09c	<i>rpl502</i>	-3	144	SPCC1919.05	SPCC1919.05	-1
35	SPAC25H1.07	<i>emc1</i>	-3	145	SPAC1B1.04c	SPAC1B1.04c	-1
36	SPAC3A12.13c	SPAC3A12.13c	-3	146	SPAC1783.08c	<i>rpl1502</i>	-1
37	SPAC1F5.08c	<i>yam8</i>	-3	147	SPBC3B9.13c	<i>rpp102</i>	-1
38	SPCC550.14	<i>vgl1</i>	-3	148	SPAC1783.02c	<i>vps66</i>	-1
39	SPCC576.12c	<i>mhf2</i>	-3	149	SPAC7D4.12c	SPAC7D4.12c	-1

Sintético letal/enfermo	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Sintético letal/enfermo	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)
41	SPBC902.02c	<i>ctf18</i>	-3	151	SPAC1610.01	<i>SPAC1610.01</i>	-1
42	SPAC222.14c	<i>SPAC222.14c</i>	-3	152	SPBC29A3.05	<i>vps71</i>	-1
43	SPAC227.10	<i>SPAC227.10</i>	-3	153	SPCC1223.06	<i>tea1</i>	-1
44	SPAC22F8.04	<i>SPAC22F8.04</i>	-3	154	SPBPJ4664.06	<i>gpt1</i>	-1
45	SPAC25G10.06	<i>rps2801</i>	-3	155	SPCC74.02c	<i>SPCC74.02c</i>	-1
46	SPBC31E1.02c	<i>pmr1</i>	-3	156	SPBC337.15c	<i>coq7</i>	-1
47	SPBC4F6.06	<i>kin1</i>	-3	157	SPAC3H8.05c	<i>mms1</i>	-1
48	SPAC1071.04c	<i>spc2</i>	-3	158	SPBPB2B2.14c	<i>SPBPB2B2.14c</i>	-1
49	SPAC664.03	<i>SPAC664.03</i>	-3	159	SPBC1539.10	<i>nop16</i>	-1
50	SPCC830.06	<i>cnb1</i>	-2	160	SPAC31A2.15c	<i>dcc1</i>	-1
51	SPBC17G9.09	<i>tif213</i>	-2	161	SPCC24B10.18	<i>SPCC24B10.18</i>	-1
52	SPAC17A5.08	<i>erp2</i>	-2	162	SPBC18H10.13	<i>rps1402</i>	-1
53	SPAC4F10.02	<i>aap1</i>	-2	163	SPCC162.12	<i>tco89</i>	-1
54	SPBC2G2.01c	<i>liz1</i>	-2	164	SPCC970.05	<i>rpl3601</i>	-1
55	SPBC530.05	<i>prt1</i>	-2	165	SPAC14C4.06c	<i>SPAC14C4.06c</i>	-1
56	SPAC1805.04	<i>nup132</i>	-2	166	SPCC1235.13	<i>ght6</i>	-1
57	SPBC27.02c	<i>ask1</i>	-2	167	SPAC1D4.09c	<i>rff2</i>	-1
58	SPAC227.05	<i>SPAC227.05</i>	-2	168	SPAC22F8.09	<i>rrp16</i>	-1
59	SPBC16G5.15c	<i>fkh2</i>	-2	169	SPAC22E12.18	<i>SPAC22E12.18</i>	-1
60	SPAC14C4.16	<i>dad3</i>	-2	170	SPBC3B8.10c	<i>nem1</i>	-1
61	SPAC1805.07c	<i>dad2</i>	-2	171	SPBC19G7.06	<i>mbx1</i>	-1
62	SPBC3H7.03c	<i>SPBC3H7.03c</i>	-2	172	SPCC613.06	<i>rpl902</i>	-1
63	SPAC22F3.09c	<i>res2</i>	-2	173	SPCC1682.12c	<i>ubp16</i>	-1
64	SPAPB2B4.03	<i>cig2</i>	-2	174	SPBC23G7.16	<i>ctr6</i>	-1
65	SPCC1223.09	<i>SPCC1223.09</i>	-2	175	SPAC23H4.17c	<i>srb10</i>	-1
66	SPAC23H4.12	<i>alp13</i>	-2	176	SPAC222.08c	<i>SPAC222.08c</i>	-1
67	SPAC2G11.12	<i>rqh1</i>	-2	177	SPBC660.17c	<i>SPBC660.17c</i>	-1
68	SPBC725.02	<i>mpr1</i>	-2	178	SPAC4G9.16c	<i>rpl901</i>	-1
69	SPBC557.02c	<i>SPBC557.02c</i>	-2	179	SPAC227.17c	<i>SPAC227.17c</i>	-1
70	SPAC821.05	<i>SPAC821.05</i>	-2	180	SPBC106.12c	<i>SPBC106.12c</i>	-1
71	SPAC17A2.06c	<i>vps8</i>	-2	181	SPCC1235.11	<i>mpc1</i>	-1
72	SPBC16H5.08c	<i>SPBC16H5.08c</i>	-2	182	SPBC56F2.08c	<i>SPBC56F2.08c</i>	-1
73	SPCC663.11	<i>saf1</i>	-2	183	SPBC649.03	<i>rhp14</i>	-1
74	SPBC25B2.10	<i>SPBC25B2.10</i>	-2	184	SPBC83.18c	<i>fic1</i>	-1
75	SPAC664.02c	<i>arp8</i>	-2	185	SPAC24B11.09	<i>mpc2</i>	-1
76	SPBC4F6.12	<i>pxl1</i>	-2	186	SPAC22F8.02c	<i>pvg5</i>	-1
77	SPCC895.07	<i>alp14</i>	-2	187	SPAC4F10.14c	<i>btf3</i>	-1
78	SPBP8B7.28c	<i>stc1</i>	-2	188	SPBC428.02c	<i>eca39</i>	-1
79	SPAC1F7.01c	<i>spt6</i>	-2	189	SPAC16E8.01	<i>shd1</i>	-1
80	SPCC417.07c	<i>mto1</i>	-2	190	SPBC16E9.14c	<i>zrg17</i>	-1
81	SPCC736.08	<i>cbf11</i>	-2	191	SPBC32F12.11	<i>tdh1</i>	-1
82	SPAC9G1.12	<i>cpd1</i>	-2	192	SPCC1682.14	<i>rpl1902</i>	-1

Sintético letal/enfermo	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Sintético letal/enfermo	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)
83	SPAC3H1.05	SPAC3H1.05	-2	193	SPAC17C9.07	alg8	-1
84	SPBC17A3.06	SPBC17A3.06	-2	194	SPCC4B3.15	mid1	-1
85	SPBC336.14c	ppk26	-2	195	SPCC306.02c	SPCC306.02c	-1
86	SPCC757.09c	rnc1	-2	196	SPAC1142.08	fhl1	-1
87	SPBC11B10.10c	pht1	-2	197	SPBC1105.04c	cbp1	-1
88	SPBC25H2.15	SPBC25H2.15	-2	198	SPCC74.05	rpl2702	-1
89	SPCC1795.10c	SPCC1795.10c	-2	199	SPAC1851.03	ckb1	-1
90	SPBC3E7.09	SPBC3E7.09	-2	200	SPBC1734.12c	alg12	-1
91	SPBC577.02	rpl3801	-2	201	SPAC144.02	iec1	-1
92	SPCC1223.11	ptc2	-2	202	SPCC1682.08c	SPCC1682.08c	-1
93	SPAC4G8.04	SPAC4G8.04	-2	203	SPAC31G5.19	abo1	-1
94	SPBC685.06	rps001	-2	204	SPAC6B12.07c	SPAC6B12.07c	-1
95	SPCC550.03c	SPCC550.03c	-2	205	SPBC16C6.03c	SPBC16C6.03c	-1
96	SPCC553.01c	dbl2	-2	206	SPBC725.15	ura5	-1
97	SPAC27E2.07	pvg2	-2	207	SPAC2F3.08	sut1	-1
98	SPAC9G1.07	SPAC9G1.07	-2	208	SPBC609.02	ptn1	-1
99	SPBC16E9.09c	SPBC16E9.09c	-2	209	SPAPB17E12.08	SPAPB17E12.08	-1
100	SPAC4G9.15	erp5	-2	210	SPAC1093.01	ppr5	-1
101	SPCC417.02	dad5	-2	211	SPBC27B12.08	sip1	-1
102	SPAC2C4.05	SPAC2C4.05	-2	212	SPBPB2B2.13	gal1	-1
103	SPAC139.06	hat1	-2	213	SPAC13G7.02c	ssa1	-1
104	SPAC1782.09c	clp1	-2	214	SPAC25A8.01c	fft3	-1
105	SPBC1706.01	tea4	-2	215	SPAC1071.02	mms19	-1
106	SPBC19C2.09	sre1	-2	216	SPBC32F12.08c	duo1	-1
107	SPAC1142.07c	vps32	-2	217	SPBPB10D8.07c	SPBPB10D8.07c	-1
108	SPBC18H10.19	vps38	-2				
109	SPAC521.05	rps802	-2				
110	SPBC3H7.09	mug142	-2				

Supresor	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Supresor	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)
1	SPCC1450.03	SPCC1450.03	1	36	SPCC1322.10	SPCC1322.10	2
2	SPBC16C6.04	dbl6	1	37	SPBC36.07	iki3	2
3	SPCC16C4.20c	SPCC16C4.20c	1	38	SPBC365.10	arp5	2
4	SPCC1682.01	qcr9	1	39	SPAC10F6.13c	SPAC10F6.13c	2
5	SPAC23C11.04c	pnk1	1	40	SPAC3F10.02c	trk1	2
6	SPCC550.15c	SPCC550.15c	1	41	SPAC4C5.02c	ryh1	2
7	SPAC17G8.13c	mst2	1	42	SPBC8D2.17	SPBC8D2.17	2
8	SPCC1739.15	wtf21	1	43	SPAC16A10.03c	SPAC16A10.03c	2
9	SPAPB21F2.03	slx9	1	44	SPCC1672.04c	SPCC1672.04c	2
10	SPCC970.07c	raf2	1	45	SPAC30C2.02	mmd1	2
11	SPAC19B12.04	rps3001	1	46	SPBC18H10.07	SPBC18H10.07	2

12	SPBC31F10.14c	<i>hip3</i>	1	47	SPBC30D10.10c	<i>tor1</i>	2
13	SPBC19G7.17	SPBC19G7.17	1	48	SPBC2G2.03c	<i>sbh1</i>	2
14	SPCC24B10.12	<i>cgj121</i>	1	49	SPAC23E2.01	<i>fep1</i>	2
15	SPAC12G12.13c	<i>cid14</i>	1	50	SPAC3G9.03	<i>rpl2301</i>	2
16	SPBC19C7.02	<i>ubr1</i>	1	51	SPAC20G4.07c	<i>sts1</i>	2
17	SPBC16A3.18	<i>cjp1</i>	1	52	SPAC31A2.13c	<i>sft1</i>	2
18	SPAC1687.23c	SPAC1687.23c	1	53	SPBC19C2.14	<i>smd3</i>	2
19	SPAC1071.08	<i>rpp203</i>	1	54	SPAC31G5.21	SPAC31G5.21	2
20	SPBC21C3.01c	<i>vps13a</i>	1	55	SPAC57A10.02	<i>cdr2</i>	2
21	SPBC1347.02	<i>fkbp39</i>	1	56	SPBC1306.02	SPBC1306.02	2
22	SPBC23E6.02	<i>rrp2</i>	1	57	SPAC1527.02	<i>sft2</i>	2
23	SPCC1739.10	<i>mug33</i>	1	58	SPBC1703.12	<i>ubp9</i>	2
24	SPBC1921.07c	<i>sgf29</i>	1	59	SPCC1739.07	<i>cti1</i>	2
25	SPBC8D2.04	<i>hht2</i>	1	60	SPAC13C5.07	<i>rad32</i>	2
26	SPBC3H7.10	<i>elp6</i>	1	61	SPAC824.02	<i>bst1</i>	2
27	SPBC337.09	<i>erg28</i>	1	62	SPAC31F12.01	<i>zds1</i>	2
28	SPAC1F3.03	SPAC1F3.03	1	63	SPAC13G6.09	SPAC13G6.09	2
29	SPAC26A3.16	<i>dph1</i>	1	64	SPCC31H12.05c	<i>sds21</i>	2
30	SPAC17H9.13c	SPAC17H9.13c	1	65	SPAC222.04c	<i>ies6</i>	2
31	SPAC15A10.11	<i>ubr11</i>	1	66	SPAC630.14c	<i>tup12</i>	3
32	SPAC17H9.10c	<i>ddb1</i>	1	67	SPBC660.11	<i>tcg1</i>	3
33	SPAC1687.12c	<i>coq4</i>	1	68	SPAC11D3.18c	SPAC11D3.18c	3
34	SPBC947.10	<i>dsc1</i>	1	69	SPBC8D2.03c	<i>hhf2</i>	4
35	SPCC790.02	<i>pep3</i>	2	70	SPAC824.04	SPAC824.04	4

Tabla S2. Genes que interactúan genéticamente con *cdc2-3w* a 25°C

Sintético letal/enfermo	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Sintético letal/enfermo	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)
1	SPAC5D6.10c	<i>mug116</i>	-5	106	SPCC1235.13	<i>ght6</i>	-2
2	SPAC30C2.06c	<i>dml1</i>	-5	107	SPAC22E12.18	SPAC22E12.18	-2
3	SPBC409.08	SPBC409.08	-5	108	SPBC3H7.09	<i>mug142</i>	-2
4	SPAC1A6.07	<i>sle1</i>	-5	109	SPCC74.05	<i>rpl2702</i>	-2
5	SPAC9E9.13	<i>wos2</i>	-5	110	SPAC23C11.10	<i>mpn1</i>	-2
6	SPBC16H5.07c	<i>ppa2</i>	-4	111	SPAC18G6.10	<i>lem2</i>	-2
7	SPAC25B8.07c	SPAC25B8.07c	-4	112	SPAPB8E5.04c	SPAPB8E5.04c	-2
8	SPBC25H2.15	SPBC25H2.15	-4	113	SPCC1739.14	<i>npp106</i>	-2
9	SPBC2D10.16	<i>mhf1</i>	-4	114	SPAPB17E12.04c	<i>csn2</i>	-2
10	SPBP8B7.28c	<i>stc2</i>	-4	115	SPBC32F12.05c	<i>cnw12</i>	-1
11	SPBC216.05	<i>rad3</i>	-3	116	SPAC17A5.08	<i>erp2</i>	-1
12	SPAC9E9.08	<i>rad26</i>	-3	117	SPAC222.14c	SPAC222.14c	-1
13	SPAC14C4.13	<i>rad17</i>	-3	118	SPCC24B10.18	SPCC24B10.18	-1
14	SPAC2F7.03c	<i>pom1</i>	-3	119	SPAC14C4.06c	SPAC14C4.06c	-1
15	SPAC1952.01	<i>rad1</i>	-3	120	SPAC22F8.09	<i>rrp16</i>	-1
16	SPAC1142.07c	<i>vps32</i>	-3	121	SPAC3G6.06c	<i>rad2</i>	-1
17	SPAC664.02c	<i>arp8</i>	-3	122	SPCC1682.14	<i>rpl1902</i>	-1
18	SPBC725.02	<i>mpr1</i>	-3	123	SPBC19F8.08	<i>rps401</i>	-1
19	SPAP27G11.06c	<i>vas2</i>	-3	124	SPBC215.03c	<i>csn1</i>	-1
20	SPAC11G7.06c	<i>mug132</i>	-3	125	SPAC3G9.04	<i>ssu72</i>	-1
21	SPBC106.01	<i>mph1</i>	-3	126	SPBP16F5.05c	SPBP16F5.05c	-1
22	SPCP1E11.06	<i>apl4</i>	-3	127	SPAC20H4.07	<i>rhp57</i>	-1
23	SPBC16E9.09c	<i>erp5</i>	-3	128	SPBC14C8.03	<i>fma2</i>	-1
24	SPAC1F5.08c	<i>yam8</i>	-3	129	SPAC1039.08	SPAC1039.08	-1
25	SPAC20G4.04c	<i>hus1</i>	-3	130	SPAC17H9.13c	SPAC17H9.13c	-1
26	SPBC336.03	<i>efc25</i>	-3	131	SPBC342.05	<i>crb2</i>	-1
27	SPAP14E8.02	<i>tos4</i>	-3	132	SPBC3H7.07c	<i>ser2</i>	-1
28	SPAC25H1.07	<i>emc1</i>	-3	133	SPAC31G5.17c	<i>rps1001</i>	-1
29	SPBC29A3.05	<i>vps71</i>	-3	134	SPAC212.08c	SPAC212.08c	-1
30	SPBC3B9.13c	<i>rpp102</i>	-3	135	SPBC32F12.11	<i>tdh1</i>	-1
31	SPBC16C6.03c	SPBC16C6.03c	-3	136	SPCC126.08c	SPCC126.08c	-1
32	SPBC1718.07c	<i>zfs1</i>	-3	137	SPAC3H5.07	<i>rpl702</i>	-1
33	SPBC31F10.12	<i>tma20</i>	-3	138	SPBC15C4.05	SPBC15C4.05	-1
34	SPBC12C2.04	SPBC12C2.04	-3	139	SPAC323.05c	SPAC323.05c	-1
35	SPBC16D10.11c	<i>rps1801</i>	-3	140	SPAC6F6.01	<i>cch1</i>	-1
36	SPBC887.18c	<i>hfi1</i>	-3	141	SPAC9G1.12	<i>cpd1</i>	-1
37	SPAC30D11.04c	<i>nup124</i>	-3	142	SPAC31G5.19	<i>abo1</i>	-1
38	SPAC13A11.01c	<i>rga8</i>	-3	143	SPAC6B12.07c	SPAC6B12.07c	-1
39	SPAPB1A10.09	<i>ase1</i>	-3	144	SPBP8B7.06	<i>rpp201</i>	-1

Sintético letal/enfermo	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Sintético letal/enfermo	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)
40	SPCC1795.10c	SPCC1795.10c	-3	145	SPCC825.05c	SPCC825.05c	-1
41	SPCC576.12c	<i>mhf1</i>	-3	146	SPBC32F12.02	<i>rec14</i>	-1
42	SPAC589.10c	SPAC589.10c	-3	147	SPBC1778.02	<i>rap1</i>	-1
43	SPBC23G7.08c	<i>rga7</i>	-3	148	SPAC25G10.06	<i>rps2801</i>	-1
44	SPBC11C11.09c	<i>rpl502</i>	-3	149	SPCC550.14	<i>vgl1</i>	-1
45	SPBC16E9.14c	<i>zrg17</i>	-3	150	SPCC285.15c	<i>rps2802</i>	-1
46	SPAC664.07c	<i>rad9</i>	-2	151	SPBC4F6.12	<i>pxl1</i>	-1
47	SPAC890.05	SPAC890.05	-2	152	SPAC23D3.03c	SPAC23D3.03c	-1
48	SPAC922.07c	<i>atd2</i>	-2	153	SPCP1E11.10	SPCP1E11.10	-1
49	SPAC23D3.09	<i>arp42</i>	-2	154	SPAC16E8.08	SPAC16E8.08	-1
50	SPBPB2B2.01	SPBPB2B2.01	-2	155	SPBC17D1.06	<i>dbp3</i>	-1
51	SPCC1223.09	SPCC1223.09	-2	156	SPBC1773.01	<i>far8</i>	-1
52	SPBC3H7.03c	SPBC3H7.03c	-2	157	SPAC1071.07c	<i>rps1502</i>	-1
53	SPBC776.02c	<i>dis2</i>	-2	158	SPCC962.04	<i>rps1201</i>	-1
54	SPAC22H12.02	<i>tfg3</i>	-2	159	SPBC365.14c	<i>uge1</i>	-1
55	SPCC1322.12c	<i>bub1</i>	-2	160	SPCC1739.10	<i>mug33</i>	-1
56	SPCC830.06	<i>cnb1</i>	-2	161	SPBC1706.01	<i>tea4</i>	-1
57	SPAC19G12.08	<i>scs7</i>	-2	162	SPAC9G1.03c	<i>rpl3001</i>	-1
58	SPBC56F2.10c	<i>alg5</i>	-2	163	SPCC569.02c	SPCC569.02c	-1
59	SPBC725.15	<i>ura5</i>	-2	164	SPAC4F10.14c	<i>btf3</i>	-1
60	SPAC1D4.09c	<i>rtf2</i>	-2	165	SPCC285.09c	<i>cgs2</i>	-1
61	SPAC17A5.02c	<i>dbr1</i>	-2	166	SPAC1805.04	<i>nup132</i>	-1
62	SPCC895.07	<i>alp14</i>	-2	167	SPBC530.05	<i>prt1</i>	-1
63	SPAC4F10.19c	SPAC4F10.19c	-2	168	SPAC1805.07c	<i>dad2</i>	-1
64	SPAC23H3.06	<i>apl6</i>	-2	169	SPCC1223.06	<i>tea1</i>	-1
65	SPBP35G2.03c	<i>sgo1</i>	-2	170	SPCC736.08	<i>cbf11</i>	-1
66	SPCC1840.08c	SPCC1840.08c	-2	171	SPBPJ4664.06	<i>gpt1</i>	-1
67	SPBC947.01	<i>alf1</i>	-2	172	SPCC417.07c	<i>mto1</i>	-1
68	SPBC776.17	SPBC776.17	-2	173	SPAC31A2.02	<i>trm112</i>	-1
69	SPCC1223.11	<i>ptc2</i>	-2	174	SPAC1486.04c	<i>alm1</i>	-1
70	SPAC926.03	<i>rlc1</i>	-2	175	SPAPB17E12.05	<i>rpl3703</i>	-1
71	SPBC56F2.08c	SPBC56F2.08c	-2	176	SPAC2C4.05	SPAC2C4.05	-1
72	SPAC22F3.08c	<i>rok1</i>	-2	177	SPAC25G10.03	<i>zip1</i>	-1
73	SPAC3A12.12	<i>atp11</i>	-2	178	SPBC1718.03	<i>ker1</i>	-1
74	SPAC2H10.01	SPAC2H10.01	-2	179	SPBC119.12	<i>rud3</i>	-1
75	SPBC1703.03c	SPBC1703.03c	-2	180	SPAC1071.02	<i>mms19</i>	-1
76	SPAC3H5.12c	<i>rpl501</i>	-2	181	SPBC409.19c	SPBC409.19c	-1
77	SPAC1782.09c	<i>clp1</i>	-2	182	SPBC1685.13	<i>fnh1</i>	-1
78	SPAC1952.02	<i>tma23</i>	-2	183	SPBC776.11	<i>rpl2801</i>	-1
79	SPAC1B3.16c	<i>vht1</i>	-2	184	SPBC12D12.07c	<i>trx2</i>	-1
80	SPBC9B6.03	SPBC9B6.03	-2	185	SPAC3C7.08c	<i>elf1</i>	-1
81	SPBC18H10.10c	<i>cwc16</i>	-2	186	SPAC17D4.03c	<i>cis4</i>	-1

Sintético letal/enfermo	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Sintético letal/enfermo	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)
82	SPAC1F12.07	SPAC1F12.07	-2	187	SPBC21H7.04	dbp7	-1
83	SPBC16G5.15c	fkh2	-2	188	SPCC1223.05c	rpl3702	-1
84	SPCC594.01	SPCC594.01	-2	189	SPAC823.10c	SPAC823.10c	-1
85	SPAC18G6.15	mal3	-2	190	SPAC644.14c	rhp51	-1
86	SPAC521.05	rps802	-2	191	SPCC1223.15c	spc19	-1
87	SPCC613.06	rpl902	-2	192	SPAC22F8.04	SPAC22F8.04	-1
88	SPAC222.08c	SPAC222.08c	-2	193	SPAC3H8.05c	mms1	-1
89	SPAC24B11.09	mpc2	-2	194	SPCC1919.05	ski3	-1
90	SPAC12G12.13c	cid14	-2	195	SPBC685.06	rps001	-1
91	SPAC3C7.06c	pit1	-2	196	SPCC550.03c	SPCC550.03c	-1
92	SPAC22A12.04c	rps2201	-2	197	SPCC1682.12c	ubp16	-1
93	SPBC887.15c	sur2	-2	198	SPAC2F7.08c	snf5	-1
94	SPCC553.03	pex1	-2	199	SPCC1235.15	dga1	-1
95	SPAC4F10.04	ypa1	-2	200	SPAC140.02	gar2	-1
96	SPBC9B6.07	nop52	-2	201	SPCC1494.08c	SPCC1494.08c	-1
97	SPAC631.02	bdf2	-2	202	SPAC1783.08c	rpl1502	-1
98	SPAC31G5.18c	sde2	-2	203	SPBC25H2.08c	mrs2	-1
99	SPBC3E7.09	SPBC3E7.09	-2	204	SPBC18H10.13	rps1402	-1
100	SPBC1539.10	nop16	-2	205	SPCC285.14	trs130	-1
101	SPBC902.02c	ctf18	-2	206	SPBC337.15c	coq7	-1
102	SPAC3H1.05	SPAC3H1.05	-2	207	SPAC328.10c	rps502	-1
103	SPAC5D6.13	SPAC5D6.13	-2	208	SPAC8E11.02c	rad24	-1
104	SPAPB1E7.06c	eme1	-2	209	SPAC977.05c	SPAC977.05c	-1
105	SPBC609.02	ptn1	-2	210	SPBC1604.03c	SPBC1604.03c	-1
Supresor	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Supresor	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)
1	SPAC14C4.01c	SPAC14C4.01c	1	49	SPBC651.11c	apm3	1
2	SPCC16C4.10	SPCC16C4.10	1	50	SPAC664.15	caf4	1
3	SPBC12D12.06	srb11	1	51	SPCC4G3.08	psk1	1
4	SPCC74.02c	SPCC74.02c	1	52	SPBC1347.02	fkbp39	1
5	SPAC25B8.18	SPAC25B8.18	1	53	SPCC1919.01	ppk34	1
6	SPCC1020.13c	SPCC1020.13c	1	54	SPBC337.09	erg28	1
7	SPBC336.13c	SPBC336.13c	1	55	SPAC823.05c	tig2	1
8	SPCC553.12c	SPCC553.12c	1	56	SPAC6F12.03c	fsv1	1
9	SPAC23C11.04c	pnk1	1	57	SPAC607.06c	SPAC607.06c	1
10	SPCC306.02c	SPCC306.02c	1	58	SPCC16C4.14c	sfc4	1
11	SPCC320.06	SPCC320.06	1	59	SPCC126.04c	sgf73	1
12	SPAC57A10.12c	ura3	1	60	SPAC31F12.01	zds1	1
13	SPBC19C2.02	pmt1	1	61	SPCC553.01c	dbl2	1
14	SPCC320.14	SPCC320.14	1	62	SPAC17H9.10c	ddb1	1
15	SPAC3C7.10	pex13	1	63	SPCC1450.03	SPCC1450.03	1

Supresor	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Supresor	Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)
16	SPCC31H12.05c	sds21	1	64	SPAC2F7.07c	cph2	1
17	SPBC16C6.04	dbl6	1	65	SPAC9.13c	cwf16	1
18	SPAC26H5.05	mga2	1	66	SPBP8B7.09c	los1	1
19	SPCC31H12.03c	tho1	1	67	SPCP20C8.01c	SPCP20C8.01c	1
20	SPAPYUG7.03c	mid2	1	68	SPBC354.12	gpd3	1
21	SPBC21C3.20c	git1	1	69	SPBC2G2.03c	sbh1	1
22	SPAC15A10.11	ubr11	1	70	SPAC15A10.06	SPAC15A10.06	2
23	SPCC622.08c	hta1	1	71	SPBC16A3.07c	nrm1	2
24	SPBC27B12.08	sip1	1	72	SPBC16E9.12c	pab2	2
25	SPAC16E8.01	shd1	1	73	SPAC22F8.12c	shf1	2
26	SPAC25B8.19c	loz1	1	74	SPBC428.02c	eca39	2
27	SPBC4C3.12	sep1	1	75	SPBC651.02	SPBC651.02	2
28	SPCC1235.02	bio2	1	76	SPAC8F11.02c	dph3	2
29	SPBC1539.08	arf6	1	77	SPCC24B10.12	cgi121	2
30	SPBC1105.05	exg1	1	78	SPAC824.02	bst1	2
31	SPBC19C7.02	ubr1	1	79	SPCC970.07c	raf2	2
32	SPAC17A5.07c	ulp2	1	80	SPBC839.15c	ef1a-c	2
33	SPAC13G7.13c	msa1	1	81	SPAC222.04c	ies6	2
34	SPBC56F2.05c	SPBC56F2.05c	1	82	SPAC1F3.03	SPAC1F3.03	2
35	SPBC365.10	arp5	1	83	SPCC1682.01	qcr9	2
36	SPAC664.04c	rps1602	1	84	SPBC1198.11c	reb1	2
37	SPCC1393.08	SPCC1393.08	1	85	SPCC1672.04c	SPCC1672.04c	2
38	SPAC3A11.02	cps3	1	86	SPBC29A3.10c	atp14	2
39	SPBC1921.01c	rpl3701	1	87	SPCC126.15c	sec65	2
40	SPBC4F6.06	kin1	1	88	SPAC824.04	SPAC824.04	2
41	SPBC3H7.10	elp6	1	89	SPBC15C4.01c	oca3	2
42	SPAC15E1.03	rpl42	1	90	SPBC1703.12	ubp9	2
43	SPCC23B6.01c	SPCC23B6.01c	1	91	SPBC660.11	tcg1	2
44	SPCC364.05	vps3	1	92	SPCC18B5.05c	SPCC18B5.05c	2
45	SPCC188.02	par1	1	93	SPAC20G4.07c	sts1	3
46	SPAC589.02c	med13	1	94	SPAC2F3.12c	plp1	3
47	SPAC25H1.05	meu29	1	95	SPBC409.20c	psh3	3
48	SPAC30C2.02	mmd1	1	96	SPAC1006.03c	red1	4

Tabla S3. Interacciones genéticas con *wee1-50* y *cdc2-3w* analizadas por RSA

Cepa de Interés	Nombre ORF	Nombre Gen	SGA	RSA	Cepa de Interés	Nombre ORF	Nombre Gen	SGA	RSA
<i>wee1-50</i>	SPBC27.02c	<i>ask1</i>	-2	Letal	<i>wee1-50</i>	SPBC16H5.07c	<i>ppa2</i>	-3	Sintético fuerte
<i>wee1-50</i>	SPAC1805.07c	<i>dad2</i>	-2	Letal	<i>wee1-50</i>	SPCC1223.11	<i>ptc2</i>	-2	Sintético fuerte
<i>wee1-50</i>	SPCC895.07	<i>alp14</i>	-2	Letal	<i>wee1-50</i>	SPBC11B10.10c	<i>pht1</i>	-2	Sintético fuerte
<i>wee1-50</i>	SPBC3E7.09	SPBC3E7.09	-2	Letal	<i>wee1-50</i>	SPBC902.02c	<i>ctf18</i>	-3	Sintético fuerte
<i>wee1-50</i>	SPBC336.14c	<i>ppk26</i>	-2	Letal	<i>wee1-50</i>	SPBC16E9.09c	<i>erp5</i>	-2	Sintético fuerte
<i>wee1-50</i>	SPAC19B12.10	<i>sst2</i>	-4	Letal	<i>wee1-50</i>	SPAC9G1.07	SPAC9G1.07	-2	Sintético fuerte
<i>wee1-50</i>	SPAC14C4.13	<i>rad17</i>	-4	Letal	<i>wee1-50</i>	SPCC550.14	<i>vgl1</i>	-3	Sintético fuerte
<i>wee1-50</i>	SPCC830.06	<i>cnb1</i>	-2	Letal	<i>wee1-50</i>	SPBC16G5.15c	<i>fkh2</i>	-2	Sintético fuerte
<i>wee1-50</i>	SPCC757.09c	<i>rnc1</i>	-2	Letal	<i>wee1-50</i>	SPBC736.08	<i>cbf11</i>	-2	Sintético fuerte
<i>wee1-50</i>	SPBC530.05	<i>prt1</i>	-2	Letal	<i>wee1-50</i>	SPBC18H10.19	<i>vps38</i>	-2	Sintético fuerte
<i>wee1-50</i>	SPAC1805.04	<i>nup132</i>	-2	Letal	<i>wee1-50</i>	SPBC4F6.06	<i>kin1</i>	-3	No confirmada
<i>wee1-50</i>	SPBC16H5.08c	SPBC16H5.08c	-2	Letal	<i>wee1-50</i>	SPBC32F12.05c	<i>cwf12</i>	-3	No confirmada
<i>wee1-50</i>	SPBC25H2.15	SPBC25H2.15	-2	Letal	<i>wee1-50</i>	SPBC31E1.02c	<i>pmr1</i>	-3	No confirmada
<i>wee1-50</i>	SPBC947.01	<i>alf1</i>	-3	Letal	<i>wee1-50</i>	SPAC3A12.13c	SPAC3A12.13c	-3	No confirmada
<i>wee1-50</i>	SPAPB1A10.09	<i>ase1</i>	-4	Letal	<i>wee1-50</i>	SPBP8B7.28c	<i>stc1</i>	-2	No confirmada
<i>wee1-50</i>	SPCC1223.15c	<i>spc19</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPAC11G7.06c	<i>mug132</i>	-3	Letal
<i>wee1-50</i>	SPBC106.01	<i>mph1</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPAC2F7.03c	<i>pom1</i>	-3	Letal
<i>wee1-50</i>	SPAC14C4.16	<i>dad3</i>	-2	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPBC23G7.08c	<i>rga7</i>	-3	Letal
<i>wee1-50</i>	SPAC13A11.01c	<i>rga8</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPBC3E7.09	SPBC3E7.09	-2	Letal
<i>wee1-50</i>	SPBC23G7.08c	<i>rga7</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPBC887.18c	<i>hfi1</i>	-3	Letal
<i>wee1-50</i>	SPAC2F7.03c	<i>pom1</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPBC2D10.16	<i>mhf1</i>	-4	Letal
<i>wee1-50</i>	SPBC1706.01	<i>tea4</i>	-2	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPCC830.06	<i>cnb1</i>	-2	Letal
<i>wee1-50</i>	SPBC215.02	<i>bob1</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPAC22F3.08c	<i>rok1</i>	-2	Sintético débil
<i>wee1-50</i>	SPAC3A11.13	SPAC3A11.13	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPAC19G12.08	<i>scs7</i>	-2	Sintético débil
<i>wee1-50</i>	SPAC3H8.07c	<i>pac10</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPBC106.01	<i>mph1</i>	-3	Sintético débil
<i>wee1-50</i>	SPAC17A5.02c	<i>dbr1</i>	-2	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPBC336.03	<i>efc25</i>	-3	Sintético débil
<i>wee1-50</i>	SPBC660.14	<i>mik1</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPAC926.03	<i>rlc1</i>	-2	Sintético débil
<i>wee1-50</i>	SPAC1782.05	<i>ypa2</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPBC31F10.12	<i>tma20</i>	-3	Sintético débil
<i>wee1-50</i>	SPBC17A3.06	SPBC17A3.06	-2	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPAC3H1.05	SPAC3H1.05	-2	Sintético débil
<i>wee1-50</i>	SPAC31G5.18c	<i>sde2</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPAC664.02c	<i>arp8</i>	-3	Sintético débil
<i>wee1-50</i>	SPAC631.02	<i>nrc1</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPAC631.02	<i>nrc1</i>	-2	Sintético débil
<i>wee1-50</i>	SPBC2D10.16	<i>mhf1</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPAC31G5.18c	<i>sde2</i>	-2	Sintético débil
<i>wee1-50</i>	SPCC576.12c	<i>mhf2</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPAC14C4.13	<i>rad17</i>	-3	Sintético débil
<i>wee1-50</i>	SPBC216.05	<i>rad3</i>	-4	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPAP14E8.02	<i>tos4</i>	-3	Sintético débil
<i>wee1-50</i>	SPAC9E9.08	<i>rad26</i>	-4	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPAC664.07c	<i>rad9</i>	-2	Sintético débil
<i>wee1-50</i>	SPAC20G4.04c	<i>hus1</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPAPB1A10.09	<i>ase1</i>	-3	Sintético fuerte
<i>wee1-50</i>	SPAC664.07c	<i>rad9</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPCC895.07	<i>alp14</i>	-2	Sintético fuerte
<i>wee1-50</i>	SPAC6F6.01	<i>cch1</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPAC13A11.01c	<i>rga8</i>	-3	Sintético fuerte
<i>wee1-50</i>	SPAC1F5.08c	<i>yam8</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	SPBC216.05	<i>rad3</i>	-3	Sintético fuerte

Cepa de Interés	Nombre ORF	Nombre Gen	SGA	RSA	Cepa de Interés	Nombre ORF	Nombre Gen	SGA	RSA
<i>wee1-50</i>	<i>SPBC17G9.09</i>	<i>tif213</i>	-2	Letal	<i>cdc2-3w</i>	<i>SPAC20G4.04c</i>	<i>hus1</i>	-3	Sintético fuerte
<i>wee1-50</i>	<i>SPAC821.05</i>	<i>SPAC821.05</i>	-2	Letal	<i>cdc2-3w</i>	<i>SPAC1F5.08c</i>	<i>yam8</i>	-3	Sintético fuerte
<i>wee1-50</i>	<i>SPAC9G1.12</i>	<i>cpd1</i>	-2	Letal	<i>cdc2-3w</i>	<i>SPBC1703.03c</i>	<i>SPBC1703.03c</i>	-2	No confirmada
<i>wee1-50</i>	<i>SPAC664.03</i>	<i>SPAC664.03</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	<i>SPBC12C2.04</i>	<i>SPBC12C2.04</i>	-3	No confirmada
<i>wee1-50</i>	<i>SPAC1F7.01c</i>	<i>spt6</i>	-2	Letal	<i>cdc2-3w</i>	<i>SPAC922.07c</i>	<i>atd2</i>	-2	No confirmada
<i>wee1-50</i>	<i>SPAC2F3.02</i>	<i>SPAC2F3.02</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	<i>SPBP35G2.03c</i>	<i>sgo1</i>	-2	No confirmada
<i>wee1-50</i>	<i>SPAC222.14c</i>	<i>SPAC222.14c</i>	-3	Letal	<i>cdc2-3w</i>	<i>SPAC18G6.15</i>	<i>mal3</i>	-2	No confirmada
<i>wee1-50</i>	<i>SPAC17A5.08</i>	<i>erp2</i>	-2	Letal	<i>cdc2-3w</i>	<i>SPBC56F2.08c</i>	<i>SPBC56F2.08c</i>	-2	No confirmada
<i>wee1-50</i>	<i>SPAC17A2.06c</i>	<i>vps8</i>	-2	Letal	<i>cdc2-3w</i>	<i>SPBC29A3.05</i>	<i>vps71</i>	-3	No confirmada
<i>wee1-50</i>	<i>SPAC1142.07c</i>	<i>vps32</i>	-2	Letal	<i>cdc2-3w</i>	<i>SPBC902.02c</i>	<i>ctf18</i>	-2	No confirmada
<i>wee1-50</i>	<i>SPCC417.07c</i>	<i>mto1</i>	-2	Sintético fuerte	<i>cdc2-3w</i>	<i>SPCC1223.11</i>	<i>ptc2</i>	-2	No confirmada
<i>wee1-50</i>	<i>SPAC11G7.06c</i>	<i>mug132</i>	-4	Sintético fuerte	<i>cdc2-3w</i>	<i>SPAC4F10.19c</i>	<i>SPAC4F10.19c</i>	-2	No confirmada
<i>wee1-50</i>	<i>SPBC2G2.01c</i>	<i>liz1</i>	-2	Sintético fuerte	<i>cdc2-3w</i>	<i>SPBP8B7.28c</i>	<i>stc1</i>	-4	No confirmada
<i>wee1-50</i>	<i>SPAC18G6.15</i>	<i>mal3</i>	-3	Sintético fuerte	<i>cdc2-3w</i>	<i>SPBC1718.07c</i>	<i>zfs1</i>	-3	No confirmada
<i>wee1-50</i>	<i>SPBC4F6.12</i>	<i>pxl1</i>	-2	Sintético fuerte	<i>cdc2-3w</i>	<i>SPBC16G5.15c</i>	<i>fkh2</i>	-2	No confirmada
<i>wee1-50</i>	<i>SPBC1D7.01</i>	<i>pfid1</i>	-3	Sintético fuerte	<i>cdc2-3w</i>	<i>SPAC30D11.04c</i>	<i>nup124</i>	-3	No confirmada
<i>wee1-50</i>	<i>SPAC1834.05</i>	<i>alg9</i>	-2	Sintético fuerte					

**Tabla S4. Genes con un puntuación de interacción entre -4 y -2 con *wee1-50* a 35°C clasificados manualmente de acuerdo a lo anotado en Pombase y en la literatura**

Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Descripción funcional	Función Biológica	Ortología
SPAC25G10.06	<i>rps2801</i>	-3	40S ribosomal protein S28 (predicted)	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPBC16H5.08c	SPBC16H5.08c	-2	ribosome biogenesis ATPase, Arb family ABCF2-like (predicted)	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPBC25H2.15	SPBC25H2.15	-2	SSU-rRNA maturation protein Tsr4 homolog 1 (predicted)	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPBC577.02	<i>rpl3801</i>	-2	60S ribosomal protein L38 (predicted)	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPBC685.06	<i>rps001</i>	-2	40S ribosomal protein S0A (p40)	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPAC521.05	<i>rps802</i>	-2	40S ribosomal protein S8 (predicted)	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPBC947.01	<i>alf1</i>	-3	ATP-dependent microtubule severing protein (predicted)	Dinámica de microtúbulos	Levaduras/Humanos
SPCC417.07c	<i>mto1</i>	-2	MT organizer Mto1	Dinámica de microtúbulos	Levaduras/Humanos
SPAC11G7.06c	<i>mug132</i>	-4	<i>S. pombe</i> specific UPF0300 family protein 3	Meiosis	Levadura de Fisión
SPCC553.01c	<i>dbl2</i>	-2	meiotic chromosome segregation protein Dbl2	Meiosis	Levaduras/Humanos
SPBPB2B2.01	SPBPB2B2.01	-4	amino acid permease (predicted)	Metabolismo	Levaduras/Humanos
SPBC2G2.01c	<i>liz1</i>	-2	pantothenate transporter Liz1	Metabolismo	Levaduras/Humanos
SPBC3H7.03c	SPBC3H7.03c	-2	2-oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide) (predicted)	Metabolismo	Levaduras/Humanos
SPAC27E2.07	<i>pvg2</i>	-2	galactose residue biosynthesis protein Pvg2	Metabolismo	Levadura de Fisión
SPAC4G9.15	SPAC4G9.15	-2	ketoreductase (predicted)	Metabolismo	Levaduras/Humanos
SPBC354.12	<i>gpd3</i>	-2	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Metabolismo	Levaduras/Humanos
SPAPB1A10.09	<i>ase1</i>	-4	antiparallel microtubule cross-linking factor Ase1	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPCC1223.15c	<i>spc19</i>	-3	DASH complex subunit Spc19	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPAC18G6.15	<i>mal3</i>	-3	EB1 family Mal3	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPAC30C2.06c	<i>dml1</i>	-3	mitochondrial inheritance GTPase, tubulin-like (predicted)	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPBC106.01	<i>mph1</i>	-3	dual specificity protein kinase Mph1	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPAC227.10	SPAC227.10	-3	prefoldin subunit 2 (predicted)	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPBC27.02c	<i>ask1</i>	-2	DASH complex subunit Ask1	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPAC227.05	SPAC227.05	-2	prefoldin subunit 4 (predicted)	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPAC14C4.16	<i>dad3</i>	-2	DASH complex subunit Dad3	Mitosis	Levaduras/Humanos

Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Descripción funcional	Función Biológica	Ortología
SPAC1805.07c	<i>dad2</i>	-2	<i>DASH complex subunit Dad2</i>	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPCC895.07	<i>alp14</i>	-2	<i>TOG ortholog Alp14</i>	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPCC417.02	<i>dad5</i>	-2	<i>DASH complex subunit Dad5</i>	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPBC36.06c	<i>spo9</i>	-4	<i>farnesyl pyrophosphate synthetase</i>	Morfogénesis/citoquinesis	Levaduras/Humanos
SPAC13A11.01c	<i>rga8</i>	-3	<i>Rho-type GTPase activating protein Rga8</i>	Morfogénesis/citoquinesis	Levaduras/Humanos
SPBC23G7.08c	<i>rga7</i>	-3	<i>Rho-type GTPase activating protein Rga7</i>	Morfogénesis/citoquinesis	Levaduras/Humanos
SPAC2F7.03c	<i>pom1</i>	-3	<i>DYRK family protein kinase Pom1</i>	Morfogénesis/citoquinesis	Levaduras/Humanos
SPBC4F6.06	<i>kin1</i>	-3	<i>microtubule affinity-regulating kinase Kin1</i>	Morfogénesis/citoquinesis	Levaduras/Humanos
SPCC1223.09	SPCC1223.09	-2	<i>uricase (predicted)</i>	Morfogénesis/citoquinesis	Humanos
SPBC4F6.12	<i>pxl1</i>	-2	<i>paxillin-like protein Pxl1</i>	Morfogénesis/citoquinesis	Levaduras/Humanos
SPBC1706.01	<i>tea4</i>	-2	<i>tip elongation aberrant protein Tea4</i>	Morfogénesis/citoquinesis	Levaduras/Humanos
SPBC215.02	<i>bob1</i>	-3	<i>prefoldin subunit 5 (predicted)</i>	Plegamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAC3A11.13	SPAC3A11.13	-3	<i>prefoldin subunit 6 (predicted)</i>	Plegamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAC3H8.07c	<i>pac10</i>	-3	<i>prefoldin subunit 3 Pac10 (predicted)</i>	Plegamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAC25H1.07	<i>emc1</i>	-3	<i>ER membrane protein complex subunit Emc1 (predicted)</i>	Plegamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPBC1D7.01	<i>pfd1</i>	-3	<i>prefoldin subunit 1 (predicted)</i>	Plegamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAC4F10.02	<i>aap1</i>	-2	<i>aspartyl aminopeptidase Aap1</i>	Plegamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPBC3E7.09	SPBC3E7.09	-2	<i>Sad1-UNC-like protein involved protein folding in the ER (predicted)</i>	Plegamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPBC32F12.05c	<i>cwf12</i>	-3	<i>complexed with Cdc5 protein Cwf12</i>	Procesamiento de ARN	Levaduras/Humanos
SPCC663.11	<i>saf1</i>	-2	<i>splicing associated factor Saf1</i>	Procesamiento de ARN	Levaduras/Humanos
SPBC336.14c	<i>ppk26</i>	-2	<i>serine/threonine protein kinase, PAN complex subunit, Ppk26</i>	Procesamiento de ARN	Levaduras/Humanos
SPCC550.03c	SPCC550.03c	-2	<i>Ski complex RNA helicase Ski2 (predicted)</i>	Procesamiento de ARN	Levaduras/Humanos
SPAC17A5.02c	<i>dbr1</i>	-2	<i>RNA lariat debranching enzyme Dbr1</i>	Procesamiento de ARN	Levaduras/Humanos
SPCC825.05c	SPCC825.05c	-2	<i>splicing coactivator SRRM1 (predicted)</i>	Procesamiento de ARN	Humanos
SPAC23C11.10	<i>mpn1</i>	-2	<i>RNA processing protein (predicted)</i>	Procesamiento de ARN	Levaduras/Humanos
SPAC19B12.10	<i>sst2</i>	-4	<i>human AMSH/STAMBIP protein homolog, ubiquitin specific-protease</i>	Procesamiento de proteínas	Humanos
SPAC1071.04c	<i>spc2</i>	-3	<i>signal peptidase subunit Spc2 (predicted)</i>	Procesamiento de proteínas	Levaduras/Humanos

Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Descripción funcional	Función Biológica	Ortología
SPAC3H1.05	SPAC3H1.05	-2	CAAX prenyl protease (predicted)	Procesamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPCC1795.10c	SPCC1795.10c	-2	Sed5 Vesicle Protein Svp26 (predicted)	Procesamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPBC3H7.09	erf2	-2	palmitoyltransferase Erf2	Procesamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAC1834.05	alg9	-2	mannosyltransferase complex subunit Alg9 (predicted)	Procesamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPBC660.14	mik1	-3	mitotic inhibitor kinase Mik1	Regulación del ciclo celular	Levaduras/Humanos
SPAC1782.05	ypa2	-3	protein phosphatase type 2A regulator, PTPA family Ypa2	Regulación del ciclo celular	Levaduras/Humanos
SPBC16H5.07c	ppa2	-3	serine/threonine protein phosphatase Ppa2	Regulación del ciclo celular	Levaduras/Humanos
SPAPB2B4.03	cig2	-2	G1/S-specific B-type cyclin Cig2	Regulación del ciclo celular	Levaduras/Humanos
SPBC725.02	mpr1	-2	histidine-containing response regulator phosphotransferase Mpr1	Regulación del ciclo celular	Levaduras/Humanos
SPBC17A3.06	pi040	-2	phosphoprotein phosphatase (predicted)	Regulación del ciclo celular	Levaduras/Humanos
SPAC1782.09c	clp1	-2	Cdc14-related protein phosphatase Clp1/Flp1	Regulación del ciclo celular	Levaduras/Humanos
SPAC23D3.09	arp42	-3	SWI/SNF and RSC complex subunit Arp42	Remodelamiento de cromatina	Levaduras/Humanos
SPAC31G5.18c	sde2	-3	silencing defective protein Sde2	Remodelamiento de cromatina	Humanos
SPAC631.02	nrc1	-3	bromodomain protein (predicted)	Remodelamiento de cromatina	Levaduras/Humanos
SPAC23H4.12	alp13	-2	MRG family Clr6 histone deacetylase complex subunit Alp13	Remodelamiento de cromatina	Levaduras/Humanos
SPAC664.02c	arp8	-2	actin-like protein, Ino80 complex subunit Arp8	Remodelamiento de cromatina	Levaduras/Humanos
SPBP8B7.28c	stc1	-2	LIM-like protein linking chromatin modification to RNAi, Stc1	Remodelamiento de cromatina	Levadura de Fisión
SPBC11B10.10c	pht1	-2	histone H2A variant H2A.Z, Pht1	Remodelamiento de cromatina	Levaduras/Humanos
SPAC139.06	hat1	-2	histone acetyltransferase Hat1	Remodelamiento de cromatina	Levaduras/Humanos
SPBC2D10.16	mhf1	-3	FANCM-MHF complex subunit Mhf1	Reparación del ADN	Levaduras/Humanos
SPCC576.12c	mhf2	-3	FANCM-MHF complex subunit Mhf2	Reparación del ADN	Levaduras/Humanos
SPAC2G11.12	rqh1	-2	RecQ type DNA helicase Rqh1	Reparación del ADN	Levaduras/Humanos
SPBC216.05	rad3	-4	ATR checkpoint kinase Rad3	Replicación del ADN	Levaduras/Humanos
SPAC14C4.13	rad17	-4	RFC related checkpoint protein Rad17	Replicación del ADN	Levaduras/Humanos
SPAC9E9.08	rad26	-4	ATRIP, ATR checkpoint kinase regulatory subunit Rad26	Replicación del ADN	Levaduras/Humanos

Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Descripción funcional	Función Biológica	Ortología
SPAC1952.07	<i>rad1</i>	-3	<i>checkpoint clamp complex protein Rad1</i>	Replicación del ADN	Levaduras/Humanos
SPAC20G4.04c	<i>hus1</i>	-3	<i>checkpoint clamp complex protein Hus1</i>	Replicación del ADN	Levaduras/Humanos
SPAC664.07c	<i>rad9</i>	-3	<i>checkpoint clamp complex protein Rad9</i>	Replicación del ADN	Levaduras/Humanos
SPBC902.02c	<i>ctf18</i>	-3	<i>RFC-like complex subunit Ctf18</i>	Replicación del ADN	Levaduras/Humanos
SPAC6F6.01	<i>cch1</i>	-3	<i>calcium channel Cch1</i>	Señalización celular	Levaduras/Humanos
SPAC1F5.08c	<i>yam8</i>	-3	<i>calcium channel regulatory subunit Yam8</i>	Señalización celular	Levaduras/Humanos
SPBC31E1.02c	<i>pmr1</i>	-3	<i>P-type ATPase, calcium transporting Pmr1</i>	Señalización celular	Levaduras/Humanos
SPCC830.06	<i>cnb1</i>	-2	<i>calcineurin regulatory subunit (calcineurin B)</i>	Señalización celular	Levaduras/Humanos
SPCC1223.11	<i>ptc2</i>	-2	<i>protein phosphatase 2C Ptc2</i>	Regulación del ciclo celular	Levaduras/Humanos
SPBC25B2.10	SPBC25B2.10	-2	<i>Usp (universal stress protein) family protein</i>	Señalización celular	Hongos
SPCC757.09c	<i>mc1</i>	-2	<i>RNA-binding protein that suppresses calcineurin deletion Rnc1</i>	Señalización celular	Levaduras/Humanos
SPBC16E9.09c	<i>erp5</i>	-2	<i>COPII vesicle coat component Erp5/Erp6 (predicted)</i>	Señalización celular	Levaduras/Humanos
SPAC212.03	SPAC212.03	-3	<i>hypothetical protein</i>	Sin caracterizar	Levadura de Fisión
SPBC557.02c	SPBC557.02c	-2	<i>conserved fungal protein</i>	Sin caracterizar	Levadura de Fisión
SPAC9G1.07	SPAC9G1.07	-2	<i>sequence orphan</i>	Sin caracterizar	Levadura de Fisión
SPAC212.08c	SPAC212.08c	-2	<i>GPI anchored protein (predicted)</i>	Sin caracterizar	Levaduras/Humanos
SPCC569.02c	SPCC569.02c	-2	<i>S. pombe specific UPF0321 family protein 2</i>	Sin caracterizar	Levadura de Fisión
SPBC11C11.09c	<i>rpl502</i>	-3	<i>60S ribosomal protein L5</i>	Traducción	Levaduras/Humanos
SPAC3A12.13c	SPAC3A12.13c	-3	<i>translation initiation factor eIF3j (p35)</i>	Traducción	Levaduras/Humanos
SPCC550.14	<i>vgl1</i>	-3	<i>vigilin (predicted)</i>	Traducción	Levaduras/Humanos
SPBC17G9.09	<i>tif213</i>	-2	<i>translation initiation factor eIF2 gamma subunit (predicted)</i>	Traducción	Levaduras/Humanos
SPAC821.05	SPAC821.05	-2	<i>translation initiation factor eIF3h (p40)</i>	Traducción	Humanos
SPAC9G1.12	<i>cpd1</i>	-2	<i>tRNA (m1A) methyltransferase complex catalytic subunit Cpd1</i>	Traducción	Levaduras/Humanos
SPAC664.03	SPAC664.03	-3	<i>RNA polymerase II associated Paf1 complex (predicted)</i>	Transcripción	Levaduras/Humanos
SPBC530.05	<i>prt1</i>	-2	<i>transcription factor (predicted)</i>	Transcripción	Levaduras/Humanos
SPBC16G5.15c	<i>fkh2</i>	-2	<i>forkhead transcription factor Fkh2</i>	Transcripción	Levaduras/Humanos
SPAC22F3.09c	<i>res2</i>	-2	<i>MBF transcription factor complex subunit Res2</i>	Transcripción	Levaduras/Humanos

Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Descripción funcional	Función Biológica	Ortología
SPAC1F7.01c	spt6	-2	nucleosome remodeling protein Spt6	Transcripción	Levaduras/Humanos
SPCC736.08	cbf11	-2	CBF1/Su(H)/LAG-1 family transcription factor Cbf11	Transcripción	Humanos
SPBC19C2.09	sre1	-2	sterol regulatory element binding protein, transcription factor Sre1	Transcripción	Humanos
SPBC1198.11c	reb1	-2	RNA polymerase I transcription termination factor Reb1	Transcripción	Levaduras/Humanos
SPAC2F3.02	SPAC2F3.02	-3	ER protein translocation subcomplex subunit Sec72 (predicted)	Transporte de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAC222.14c	SPAC222.14c	-3	GTP binding protein Sey1 (predicted)	Transporte de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAC22F8.04	SPAC22F8.04	-3	triose phosphate transporter (predicted)	Transporte de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAC17A5.08	erp2	-2	COPII-coated vesicle component Erp2/3/4 (predicted)	Transporte de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAC17A2.06c	vps8	-2	WD repeat protein Vps8 (predicted)	Transporte de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAC4G8.04	SPAC4G8.04	-2	GTPase activating protein (predicted)	Transporte de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAC2C4.05	SPAC2C4.05	-2	cornichon family protein (predicted)	Transporte de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAC1142.07c	vps32	-2	ESCRT III complex subunit Vps32	Transporte de proteínas	Levaduras/Humanos
SPBC18H10.19	vps38	-2	phosphatidylinositol 3-kinase complex subunit Vps38	Transporte de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAC1805.04	nup132	-2	nucleoporin Nup132	Transporte nucleocitoplásmico	Levaduras/Humanos

**Tabla S5.** Genes con un puntuación de interacción entre -4 y -2 con *cdc2-3w* a 25°C clasificados manualmente de acuerdo a lo anotado en Pombase. y en la literatura

Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Descripción funcional	Función Biológica	Ortología
SPBC1703.03c	SPBC1703.03c	-2	<i>armadillo repeat protein (predicted)</i>	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPAC22F3.08c	<i>rok1</i>	-2	<i>ATP-dependent RNA helicase Rok1 (predicted)</i>	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPBC25H2.15	SPBC25H2.15	-4	<i>SSU-rRNA maturation protein Tsr4 homolog 1 (predicted)</i>	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPBC3B9.13c	<i>rpp102</i>	-3	<i>60S acidic ribosomal protein A3</i>	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPBC16C6.03c	SPBC16C6.03c	-3	<i>ribosome assembly protein (predicted)</i>	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPBC16D10.11c	<i>rps1801</i>	-3	<i>40S ribosomal protein S18 (predicted)</i>	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPAC589.10c	SPAC589.10c	-3	<i>ribosomal-ubiquitin fusion protein Ubi5 (predicted)</i>	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPBC11C11.09c	<i>rpl502</i>	-3	<i>60S ribosomal protein L5</i>	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPAC890.05	SPAC890.05	-2	<i>ribosome biogenesis protein, G-patch domain, PINX1 family (predicted)</i>	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPBC776.17	SPBC776.17	-2	<i>rRNA processing protein Rrp7 (predicted)</i>	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPAC3H5.12c	<i>rpl501</i>	-2	<i>60S ribosomal protein L5 (predicted)</i>	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPAC1952.02	<i>tma23</i>	-2	<i>ribosome biogenesis protein Tma23 (predicted)</i>	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPAC521.05	<i>rps802</i>	-2	<i>40S ribosomal protein S8 (predicted)</i>	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPCC613.06	<i>rpl902</i>	-2	<i>60S ribosomal protein L9</i>	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPAC12G12.13c	<i>cid14</i>	-2	<i>poly(A) polymerase Cid14</i>	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPAC22A12.04c	<i>rps2201</i>	-2	<i>40S ribosomal protein S15a (predicted)</i>	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPBC9B6.07	<i>nop52</i>	-2	<i>nucleolar protein Nop52 family (predicted)</i>	Biogénesis ribosomas	Levaduras/Humanos
SPBC1539.10	<i>nop16</i>	-2	<i>ribosome biogenesis protein Nop16 (predicted)</i>	Biogénesis Ribosomas	Levaduras/Humanos
SPCC74.05	<i>rpl2702</i>	-2	<i>60S ribosomal protein L27 (predicted)</i>	Biogénesis Ribosomas	Levaduras/Humanos
SPBC947.01	<i>alf1</i>	-2	<i>ATP-dependent microtubule severing protein (predicted)</i>	Dinámica de microtúbulos	Levaduras/Humanos
SPAC1A6.07	<i>sle1</i>	-5	<i>eisosome assembly protein Seg1</i>	Endocitosis	Levaduras
SPAC11G7.06c	<i>mug132</i>	-3	<i>S. pombe specific UPF0300 family protein 3</i>	Meiosis	Levadura de fisión
SPAC3C7.06c	<i>pit1</i>	-2	<i>serine/threonine protein kinase, meiotic Pit1</i>	Meiosis	Levaduras/Humanos
SPBC12C2.04	SPBC12C2.04	-3	<i>NAD binding dehydrogenase family protein</i>	Metabolismo	Humanos
SPAC922.07c	<i>atd2</i>	-2	<i>aldehyde dehydrogenase (predicted)</i>	Metabolismo	Levaduras/Humanos

Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Descripción funcional	Función Biológica	Ortología
SPAC19G12.08	<i>scs7</i>	-2	<i>sphingosine hydroxylase Scs7</i>	Metabolismo	Levaduras/Humanos
SPBC16E9.14c	<i>zrg17</i>	-3	<i>cation diffusion family zinc membrane transporter Zrg17</i>	Metabolismo	Levaduras
SPBPB2B2.01	SPBPB2B2.01	-2	<i>amino acid permease (predicted)</i>	Metabolismo	Levaduras
SPCC1223.09	SPCC1223.09	-2	<i>uricase (predicted)</i>	Metabolismo	Humanos
SPBC3H7.03c	SPBC3H7.03c	-2	<i>2-oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide) (predicted)</i>	Metabolismo	Levaduras/Humanos
SPBC725.15	<i>ura5</i>	-2	<i>orotate phosphoribosyltransferase Ura5</i>	Metabolismo	Levaduras/Humanos
SPAC3A12.12	<i>atp11</i>	-2	<i>F1-ATPase chaperone Atp11 (predicted)</i>	Metabolismo	Levaduras/Humanos
SPAC1F12.07	SPAC1F12.07	-2	<i>phosphoserine aminotransferase (predicted)</i>	Metabolismo	Levaduras/Humanos
SPAC222.08c	SPAC222.08c	-2	<i>glutamine aminotransferase subunit (predicted)</i>	Metabolismo	Levaduras
SPAC24B11.09	<i>mpc2</i>	-2	<i>mitochondrial pyruvate transmembrane transporter subunit Mpc2</i>	Metabolismo	Levaduras/Humanos
SPBC887.15c	<i>sur2</i>	-2	<i>sphingosine hydroxylase Sur2</i>	Metabolismo	Levaduras
SPCC1235.13	<i>ght6</i>	-2	<i>hexose transporter Ght6</i>	Metabolismo	Levaduras
SPBP35G2.03c	<i>sgo1</i>	-2	<i>inner centromere protein, shugoshin, Sgo1</i>	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPAC18G6.15	<i>mal3</i>	-2	<i>EB1 family Mal3</i>	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPAPB1A10.09	<i>ase1</i>	-3	<i>antiparallel microtubule cross-linking factor Ase1</i>	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPCC895.07	<i>alp14</i>	-2	<i>TOG ortholog Alp14</i>	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPBC106.01	<i>mph1</i>	-3	<i>dual specificity protein kinase Mph1</i>	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPAC30C2.06c	<i>dml1</i>	-5	<i>mitochondrial inheritance GTPase, tubulin-like (predicted)</i>	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPCC1322.12c	<i>bub1</i>	-2	<i>serine/threonine protein kinase Bub1</i>	Mitosis	Levaduras/Humanos
SPAC2F7.03c	<i>pom1</i>	-3	<i>DYRK family protein kinase Pom1</i>	Morfogénesis/citoquinesis	Levaduras/Humanos
SPBC23G7.08c	<i>rga7</i>	-3	<i>Rho-type GTPase activating protein Rga7</i>	Morfogénesis/citoquinesis	Levaduras/Humanos
SPAC13A11.01c	<i>rga8</i>	-3	<i>Rho-type GTPase activating protein Rga8</i>	Morfogénesis/citoquinesis	Levaduras
SPBC336.03	<i>efc25</i>	-3	<i>Ras1 guanyl-nucleotide exchange factor Efc25</i>	Morfogénesis/citoquinesis	Levaduras/Humanos
SPAC926.03	<i>rlc1</i>	-2	<i>myosin II regulatory light chain Rlc1</i>	Morfogénesis/citoquinesis	Levaduras/Humanos
SPAC25H1.07	<i>emc1</i>	-3	<i>ER membrane protein complex subunit Emc1 (predicted)</i>	Plegamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPCC1840.08c	SPCC1840.08c	-2	<i>protein disulfide isomerase (predicted)</i>	Plegamiento de proteínas	Levaduras
SPBC3E7.09	SPBC3E7.09	-2	<i>Sad1-UNC-like protein involved protein folding in the ER (predicted)</i>	Plegamiento de proteínas	Levaduras/Humanos

Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Descripción funcional	Función Biológica	Ortología
SPBC56F2.08c	SPBC56F2.08c	-2	RNA-binding protein (predicted)	Procesamiento de ARN	Levaduras
SPBC1718.07c	<i>zfs1</i>	-3	CCCH tandem zinc finger protein, human Tristetraprolin homolog <i>Zfs1</i>	Procesamiento de ARN	Levaduras/Humanos
SPBC31F10.12	<i>tma20</i>	-3	RNA-binding protein <i>Tma20</i> (predicted)	Procesamiento de ARN	Levaduras/Humanos
SPAC17A5.02c	<i>dbr1</i>	-2	RNA lariat debranching enzyme <i>Dbr1</i>	Procesamiento de ARN	Levaduras/Humanos
SPBC18H10.10c	<i>saf4</i>	-2	splicing associated factor <i>Saf4</i>	Procesamiento de ARN	Humanos
SPAC18G6.10	<i>lem2</i>	-2	LEM domain protein <i>Heh1/Lem2</i>	Procesamiento de ARN	Levaduras/Humanos
SPAC23C11.10	<i>mpn1</i>	-2	RNA processing protein (predicted)	Procesamiento de ARN	Levaduras/Humanos
SPAC3H1.05	SPAC3H1.05	-2	CAAX prenyl protease (predicted)	Procesamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPCC1795.10c	SPCC1795.10c	-3	<i>Sed5</i> Vesicle Protein <i>Svp26</i> (predicted)	Procesamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPBC56F2.10c	<i>alg5</i>	-2	dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase <i>Alg5</i> (predicted)	Procesamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAPB17E12.04c	<i>csn2</i>	-2	COP9/signalosome complex subunit <i>Csn2</i>	Procesamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAC5D6.13	SPAC5D6.13	-2	Golgi phosphoprotein 3 family (predicted)	Procesamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPBC3H7.09	<i>erf2</i>	-2	palmitoyltransferase <i>Erf2</i>	Procesamiento de proteínas	Levaduras/Humanos
SPBC776.02c	<i>dis2</i>	-2	serine/threonine protein phosphatase <i>PP1</i>	Regulación del ciclo celular	Levaduras/Humanos
SPAC1782.09c	<i>clp1</i>	-2	<i>Cdc14</i> -related protein phosphatase <i>Clp1/Flp1</i>	Regulación del ciclo celular	Levaduras/Humanos
SPAC4F10.04	<i>ypa1</i>	-2	protein phosphatase type 2A regulator, PTPA family <i>Ypa1</i>	Regulación del ciclo celular	Levaduras/Humanos
SPAC9E9.13	<i>wos2</i>	-5	p23 homolog, predicted co-chaperone <i>Wos2</i>	Regulación del ciclo celular	Levaduras/Humanos
SPBC16H5.07c	<i>ppa2</i>	-4	serine/threonine protein phosphatase <i>Ppa2</i>	Regulación del ciclo celular	Levaduras/Humanos
SPBC725.02	<i>mpr1</i>	-3	histidine-containing response regulator phosphotransferase <i>Mpr1</i>	Regulación del ciclo celular	Levaduras
SPBC887.18c	<i>hfi1</i>	-3	SAGA complex subunit <i>Hfi1</i>	Remodelamiento de cromatina	Levaduras/Humanos
SPBC29A3.05	<i>vps71</i>	-3	<i>Swr1</i> complex subunit <i>Vps71</i>	Remodelamiento de cromatina	Levaduras/Humanos
SPBP8B7.28c	<i>stc1</i>	-4	LIM-like protein linking chromatin modification to RNAi, <i>Stc1</i>	Remodelamiento de cromatina	Levadura de fisión
SPAC664.02c	<i>arp8</i>	-3	actin-like protein, <i>Ino80</i> complex subunit <i>Arp8</i>	Remodelamiento de cromatina	Levaduras/Humanos
SPAC631.02	<i>nrc1</i>	-2	bromodomain protein (predicted)	Remodelamiento de cromatina	Levaduras/Humanos
SPAC31G5.18c	<i>sde2</i>	-2	silencing defective protein <i>Sde2</i>	Remodelamiento de cromatina	Humanos
SPAC23D3.09	<i>arp42</i>	-2	SWI/SNF and RSC complex subunit <i>Arp42</i>	Remodelamiento de cromatina	Levaduras/Humanos
SPBC2D10.16	<i>mhf1</i>	-4	FANCM-MHF complex subunit <i>Mhf1</i>	Reparación del ADN	Levaduras/Humanos

Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Descripción funcional	Función Biológica	Ortología
SPCC576.12c	<i>mhf2</i>	-3	<i>FANCM-MHF complex subunit Mhf2</i>	Reparación del ADN	Levaduras/Humanos
SPAPB1E7.06c	<i>eme1</i>	-2	<i>Holliday junction resolvase subunit Eme1</i>	Reparación del ADN	Levaduras/Humanos
SPBC902.02c	<i>ctf18</i>	-2	<i>RFC-like complex subunit Ctf18</i>	Replicación del ADN	Levaduras/Humanos
SPBC216.05	<i>rad3</i>	-3	<i>ATR checkpoint kinase Rad3</i>	Replicación del ADN	Levaduras/Humanos
SPAC9E9.08	<i>rad26</i>	-3	<i>ATRIP, ATR checkpoint kinase regulatory subunit Rad26</i>	Replicación del ADN	Levaduras/Humanos
SPAC20G4.04c	<i>hus1</i>	-3	<i>checkpoint clamp complex protein Hus1</i>	Replicación del ADN	Levaduras/Humanos
SPAC14C4.13	<i>rad17</i>	-3	<i>RFC related checkpoint protein Rad17</i>	Replicación del ADN	Levaduras/Humanos
SPAP14E8.02	<i>tos4</i>	-3	<i>FHA domain protein Tos4 (predicted)</i>	Replicación del ADN	Levaduras/Humanos
SPAC664.07c	<i>rad9</i>	-2	<i>checkpoint clamp complex protein Rad9</i>	Replicación del ADN	Levaduras/Humanos
SPAC1D4.09c	<i>rtf2</i>	-2	<i>replication termination factor Rtf2</i>	Replicación del ADN	Humanos
SPCC830.06	<i>cnb1</i>	-2	<i>calcineurin regulatory subunit (calcineurin B)</i>	Señalización celular	Levaduras/Humanos
SPCC1223.11	<i>ptc2</i>	-2	<i>protein phosphatase 2C Ptc2</i>	Señalización celular	Levaduras/Humanos
SPAC1F5.08c	<i>yam8</i>	-3	<i>calcium channel regulatory subunit Yam8</i>	Señalización celular	Levaduras
SPBC609.02	<i>ptn1</i>	-2	<i>phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate3-phosphatase Ptn1</i>	Señalización celular	Levaduras/Humanos
SPAC4F10.19c	SPAC4F10.19c	-2	<i>zf-HIT protein Hit1 (predicted)</i>	Sin caracterizar	Levaduras/Humanos
SPAC5D6.10c	<i>mug116</i>	-5	<i>sequence orphan</i>	Sin caracterizar	Levadura de fisión
SPAC25B8.07c	SPAC25B8.07c	-4	<i>hypoxia induced family protein</i>	Sin caracterizar	Levaduras/Humanos
SPAC1952.01	SPAC1952.01	-3	<i>Pig-U (predicted)</i>	Sin caracterizar	Levaduras/Humanos
SPBC9B6.03	SPBC9B6.03	-2	<i>zf-FYVE type zinc finger protein</i>	Sin caracterizar	Levaduras/Humanos
SPCC594.01	SPCC594.01	-2	<i>DUF1769 family protein</i>	Sin caracterizar	Levadura de fisión
SPCC553.03	<i>pex1</i>	-2	<i>AAA family ATPase Pex1 (predicted)</i>	Sin caracterizar	Levaduras/Humanos
SPAC22E12.18	SPAC22E12.18	-2	<i>conserved fungal protein</i>	Sin caracterizar	Levaduras
SPBC16G5.15c	<i>fkh2</i>	-2	<i>forkhead transcription factor Fkh2</i>	Transcripción	Levaduras
SPAC22H12.02	<i>tfg3</i>	-2	<i>transcription factor TFIIIF complex subunit Tfg3</i>	Transcripción	Levaduras/Humanos
SPAC2H10.01	SPAC2H10.01	-2	<i>transcription factor, zf-fungal binuclear cluster type (predicted)</i>	Transcripción	Hongos
SPBC409.08	SPBC409.08	-5	<i>spermine family transporter (predicted)</i>	Transporte celular	Levaduras
SPAC1B3.16c	<i>vht1</i>	-2	<i>vitamin H transporter Vth1</i>	Transporte celular	Levaduras

Nombre ORF	Nombre Gen	Puntuación (SGA)	Descripción funcional	Función Biológica	Ortología
SPAPB8E5.04c	SPAPB8E5.04c	-2	<i>Niemann-Pick disease type C2 protein hE1 homolog (predicted)</i>	Transporte celular	Levaduras/Humanos
SPAC1142.07c	<i>vps32</i>	-3	<i>ESCRT III complex subunit Vps32</i>	Transporte de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAP27G11.06c	<i>vas2</i>	-3	<i>AP-1 adaptor complex sigma subunit Aps1</i>	Transporte de proteínas	Levaduras/Humanos
SPCP1E11.06	<i>apl4</i>	-3	<i>AP-1 adaptor complex gamma subunit Apl4</i>	Transporte de proteínas	Levaduras/Humanos
SPBC16E9.09c	<i>erp5</i>	-3	<i>COPII vesicle coat component Erp5/Erp6 (predicted)</i>	Transporte de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAC23H3.06	<i>apl6</i>	-2	<i>AP-3 adaptor complex subunit Apl6 (predicted)</i>	Transporte de proteínas	Levaduras/Humanos
SPAC30D11.04c	<i>nup124</i>	-3	<i>nucleoporin Nup124</i>	Transporte nucleocitoplásmico	Levaduras/Humanos
SPCC1739.14	<i>npp106</i>	-2	<i>nucleoporin Npp106</i>	Transporte nucleocitoplásmico	Levaduras/Humanos

**Tabla S6. Análisis funcional de la red de interacciones genéticas de *wee1-50* con *Gene list anayser***

Ciclo celular (28/118)	Biogénesis y organización del citoesqueleto (17/118)	Señalización celular (23/118)	Biogénesis y organización de organelos (24/118)	Plegamiento de proteínas (28/118)	Cromosoma (22/118)	Centro de organización de microtúbulos (7/118)
SPBC16G5.15C	SPAC18G6.15	SPBC17A3.06	SPBC16G5.15C	SPBC215.02	SPAC139.06	SPAPB1A10.09
SPBC660.14	SPAPB1A10.09	SPCC757.09C	SPAC139.06	SPAC3A11.13	SPAC1F7.01C	SPCC417.07C
SPAC18G6.15	SPCC1223.15C	SPAC13A11.01C	SPAC18G6.15	SPAC18G6.15	SPCC1223.15C	SPBC106.01
SPAPB1A10.09	SPAC13A11.01C	SPBC216.05	SPAC1F7.01C	SPAPB1A10.09	SPBC216.05	SPAC1805.07C
SPCC1223.15C	SPCC417.07C	SPBC725.02	SPBC1198.11C	SPCC757.09C	SPBC106.01	SPCC895.07
SPCC417.07C	SPBC902.02C	SPBC106.01	SPCC1223.15C	SPAC13A11.01C	SPAC20G4.04C	SPAC1782.09C
SPBC216.05	SPCC417.02	SPAC20G4.04C	SPAC664.02C	SPCC417.07C	SPAC664.02C	SPBC27.02C
SPBC725.02	SPBC1706.01	SPAC2F7.03C	SPBC11B10.10C	SPBC216.05	SPBC11B10.10C	
SPBC106.01	SPBC23G7.08C	SPBC336.14C	SPAC631.02	SPBC725.02	SPAC631.02	
SPAC20G4.04C	SPAC1805.07C	SPAC2G11.12	SPCC553.01C	SPAC20G4.04C	SPBC902.02C	
SPBC902.02C	SPCC895.07	SPBC23G7.08C	SPBC902.02C	SPAC2F7.03C	SPCC417.02	
SPCC417.02	SPAC1782.09C	SPBC19C2.09	SPCC417.02	SPAC3H8.07C	SPAC23H4.12	
SPAC2G11.12	SPBC27.02C	SPAC4G8.04	SPAC23H4.12	SPAC23H4.12	SPAC2G11.12	
SPAC22F3.09C	SPAC1782.05	SPAC1782.09C	SPAC2G11.12	SPBC1706.01	SPAC1805.07C	
SPAC1805.07C	SPAC14C4.16	SPAC9E9.08	SPAC22F3.09C	SPAC2G11.12	SPCC895.07	
SPCC895.07	SPBC4F6.12	SPCC830.06	SPAC1805.07C	SPAC22F3.09C	SPAC1782.09C	
SPAC1805.04	SPBC4F6.06	SPAC1952.07	SPAC30C2.06C	SPBC1D7.01	SPBC27.02C	
SPAC1782.09C		SPBC16H5.07C	SPAC664.03	SPCC895.07	SPAC1952.07	
SPAC9E9.08		SPAC2C4.05	SPCC736.08	SPAC1805.04	SPAC23D3.09	
SPBC27.02C		SPBC4F6.12	SPAC1782.09C	SPAC1782.09C	SPAC14C4.16	
SPAC1952.07		SPAC664.07C	SPCC550.14	SPAC1952.07	SPAC664.07C	
SPBC16H5.07C		SPCC1223.11	SPBC27.02C	SPAC227.05	SPAC14C4.13	
SPAC1782.05		SPAC14C4.13	SPAC23D3.09	SPBC4F6.12		
SPAC14C4.16			SPAC14C4.16	SPAPB2B4.03		
SPBC4F6.12				SPAC227.10		
SPAPB2B4.03				SPBC36.06C		
SPAC664.07C				SPAC664.07C		
SPAC14C4.13				SPBC685.06		

Tabla S7. Análisis funcional de la red de interacción genéticas de *wee1-50* con BiNGO

GO ID	Descripción	p-val	corr p-val	cluster freq	total freq	Genes
65007	<i>biological regulation</i>	3,45E-10	4,72E-02	53/97 54.6%	1313/5232 25.0%	SPCC550.03C MIK1 SPAC3A12.13C RAD9 LIZ1 VGL1 RNC1 ASE1 CLP1 MPH1 RAD26 PPK26 SPAC664.03 RQH1 TIF213 NUP132 RAD1 SPC19 CIG2 RAD3 PMR1 RAD17 ARP42 CCH1 MAL3 SPT6 TEA4 HUS1 KIN1 HAT1 SPAC821.05 CTF18 DAD2 POM1 DAD5 ASK1 REB1 DAD3 ALP14 PXL1 YAM8 SPAC4G8.04 FKH2 RES2 RGA8 RGA7 PPA2 ALP13 SPCC1795.10C CBF11 SRE1 MPR1 PTC2
50794	<i>regulation of cellular process</i>	3,08E-09	9,47E-02	46/97 47.4%	1088/5232 20.7%	ARP42 SPCC550.03C SPT6 MAL3 CCH1 TEA4 HUS1 KIN1 MIK1 HAT1 SPAC3A12.13C RAD9 LIZ1 SPAC821.05 VGL1 RNC1 ASE1 CLP1 MPH1 POM1 RAD26 REB1 ALP14 PXL1 PPK26 YAM8 SPAC664.03 SPAC4G8.04 RQH1 FKH2 TIF213 RGA8 RES2 RGA7 NUP132 PPA2 ALP13 CIG2 RAD1 RAD3 CBF11 SRE1 PMR1 MPR1 PTC2 RAD17
31573	<i>intra-S DNA damage checkpoint</i>	3,45E-09	1,25E-01	7/97 7.2%	15/5232 0.2%	RAD1 RAD3 HUS1 RQH1 RAD9 RAD17 RAD26
50789	<i>regulation of biological process</i>	6,63E-09	1,35E-01	46/97 47.4%	1113/5232 21.2%	ARP42 SPCC550.03C SPT6 MAL3 CCH1 TEA4 HUS1 KIN1 MIK1 HAT1 SPAC3A12.13C RAD9 LIZ1 SPAC821.05 VGL1 RNC1 ASE1 CLP1 MPH1 POM1 RAD26 REB1 ALP14 PXL1 PPK26 YAM8 SPAC664.03 SPAC4G8.04 RQH1 FKH2 TIF213 RGA8 RES2 RGA7 NUP132 PPA2 ALP13 CIG2 RAD1 RAD3 CBF11 SRE1 PMR1 MPR1 PTC2 RAD17
75	<i>cell cycle checkpoint</i>	1,99E-08	1,74E-01	13/97 13.4%	98/5232 1.8%	ALP14 RQH1 HUS1 MIK1 RAD9 NUP132 RAD1 RAD3 ASE1 CLP1 MPH1 RAD26 RAD17
51313	<i>attachment of spindle microtubules to chromosome</i>	4,79E-08	2,06E-01	9/97 9.2%	42/5232 0.8%	ALP14 SPC19 CTF18 MAL3 CLP1 DAD2 DAD5 DAD3 ASK1
34453	<i>microtubule anchoring</i>	7,38E-08	2,06E-01	9/97 9.2%	44/5232 0.8%	ALP14 SPC19 CTF18 MAL3 CLP1 DAD2 DAD5 DAD3 ASK1
7051	<i>spindle organization</i>	9,09E-08	2,06E-01	9/97 9.2%	45/5232 0.8%	ALP14 SPC19 MAL3 ASE1 DAD2 DAD5 DAD3 ASK1 MTO1
48519	<i>negative regulation of biological process</i>	1,32E-07	2,06E-01	21/97 21.6%	309/5232 5.9%	ALP14 PXL1 ARP42 RQH1 HUS1 MIK1 HAT1 RAD9 PPA2 NUP132 RAD1 VGL1 RNC1 CLP1 CBF11 SRE1 MPH1 POM1 RAD26 RAD17 REB1
32507	<i>maintenance of protein location</i>	1,99E-07	2,06E-01	10/97 10.3%	64/5232 1.2%	ALP14 SPC19 CTF18 MAL3 CLP1 SPCC1795.10C DAD2 DAD5 DAD3 ASK1
45185	<i>maintenance of protein location</i>	2,31E-07	2,06E-01	10/97 10.3%	65/5232 1.2%	ALP14 SPC19 CTF18 MAL3 CLP1 SPCC1795.10C DAD2 DAD5 DAD3 ASK1
48523	<i>negative regulation of cellular process</i>	2,89E-07	2,06E-01	20/97 20.6%	295/5232 5.6%	ALP14 PXL1 ARP42 RQH1 HUS1 MIK1 HAT1 RAD9 PPA2 NUP132 RAD1 VGL1 RNC1 CLP1 CBF11 MPH1 POM1 RAD26 RAD17 REB1
7010	<i>cytoskeleton organization</i>	2,95E-07	2,06E-01	17/97 17.5%	215/5232 4.1%	ALP14 PXL1 MAL3 TEA4 KIN1 RGA8 RGA7 SPC19 CTF18 ASE1 CLP1 DAD2 POM1 DAD5 DAD3 MTO1 ASK1
7052	<i>mitotic spindle organization</i>	2,99E-07	2,06E-01	7/97 7.2%	26/5232 0.4%	ALP14 SPC19 ASE1 DAD2 DAD5 DAD3 ASK1
51651	<i>maintenance of location in cell</i>	3,11E-07	2,06E-01	10/97 10.3%	67/5232 1.2%	ALP14 SPC19 CTF18 MAL3 CLP1 SPCC1795.10C DAD2 DAD5 DAD3 ASK1
51235	<i>maintenance of location</i>	3,59E-07	2,06E-01	10/97 10.3%	68/5232 1.2%	ALP14 SPC19 CTF18 MAL3 CLP1 SPCC1795.10C DAD2 DAD5 DAD3 ASK1
7080	<i>mitotic metaphase plate congression</i>	3,65E-07	2,06E-01	6/97 6.1%	17/5232 0.3%	SPC19 CLP1 DAD2 DAD5 DAD3 ASK1
51310	<i>metaphase plate congression</i>	3,65E-07	2,45E-01	6/97 6.1%	17/5232 0.3%	SPC19 CLP1 DAD2 DAD5 DAD3 ASK1
51303	<i>establishment of chromosome localization</i>	3,65E-07	2,45E-01	6/97 6.1%	17/5232 0.3%	SPC19 CLP1 DAD2 DAD5 DAD3 ASK1
50000	<i>chromosome localization</i>	3,65E-07	3,29E-01	6/97 6.1%	17/5232 0.3%	SPC19 CLP1 DAD2 DAD5 DAD3 ASK1
31134	<i>sister chromatide biorientation</i>	3,65E-03	7,04E-01	6/97 6.1%	17/5232 0.3%	SPC19 CLP1 DAD2 DAD5 DAD3 ASK1
42729	<i>DASH complex</i>	4,63E-07	7,39E-01	5/97 5.1%	10/5232 0.1%	SPC19 DAD2 DAD5 DAD3 ASK1
794	<i>condensed nuclear chromosome</i>	4,75E-07	8,91E-01	10/97 10.3%	70/5232 1.3%	ALP14 SPC19 RAD1 HUS1 DAD2 MPH1 RAD9 DAD5 DAD3 ASK1

GO ID	Descripción	p-val	corr p-val	cluster freq	total freq	Genes
51726	<i>regulation of cell cycle</i>	6,65E-07	1,22E+00	19/97 19.5%	282/5232 5.3%	ALP14 MAL3 RQH1 HUS1 MIK1 RAD9 LIZ1 NUP132 PPA2 CIG2 RAD1 RAD3 ASE1 CLP1 MPH1 POM1 MPR1 RAD26 RAD17
793	<i>condensed chromosome</i>	1,48E-06	1,22E+00	11/97 11.3%	98/5232 1.8%	ALP14 SPC19 RAD1 CLP1 HUS1 DAD2 MPH1 RAD9 DAD5 DAD3 ASK1
16272	<i>prefoldin complex</i>	1,62E-06	1,36E+00	4/97 4.1%	6/5232 0.1%	BOB1 SPAC227.10 SPAC3A11.13 SPAC227.05
31323	<i>regulation of cellular metabolic process</i>	2,03E-06	1,64E+00	30/97 30.9%	672/5232 12.8%	ARP42 SPCC550.03C SPT6 HUS1 MIK1 HAT1 SPAC3A12.13C RAD9 SPAC821.05 VGL1 RNC1 CLP1 REB1 RAD26 PXL1 SPAC664.03 SPAC4G8.04 RQH1 FKH2 TIF213 RGA8 RES2 RGA7 ALP13 RAD1 CIG2 CBF11 SRE1 PTC2 RAD17
19222	<i>regulation of metabolic process</i>	2,95E-06	2,29E+00	30/97 30.9%	684/5232 13.0%	ARP42 SPCC550.03C SPT6 HUS1 MIK1 HAT1 SPAC3A12.13C RAD9 SPAC821.05 VGL1 RNC1 CLP1 REB1 RAD26 PXL1 SPAC664.03 SPAC4G8.04 RQH1 FKH2 TIF213 RGA8 RES2 RGA7 ALP13 RAD1 CIG2 CBF11 SRE1 PTC2 RAD17
51640	<i>organelle localization</i>	2,98E-06	2,62E+00	10/97 10.3%	85/5232 1.6%	SPC19 SPBC16H5.08C DML1 ASE1 CLP1 DAD2 DAD5 DAD3 ASK1 MTO1
51053	<i>negative regulation of DNA metabolic process</i>	3,45E-06	2,77E+00	8/97 8.2%	51/5232 0.9%	RAD1 HUS1 RQH1 MIK1 RAD9 REB1 RAD17 RAD26
226	<i>microtubule cytoskeleton organization</i>	4,29E-06	2,77E+00	11/97 11.3%	109/5232 2.0%	ALP14 SPC19 CTF18 MAL3 ASE1 CLP1 DAD2 DAD5 DAD3 ASK1 MTO1
30896	<i>checkpoint clamp complex</i>	6,18E-06	3,73E+00	3/97 3.0%	3/5232 0.0%	RAD1 HUS1 RAD9
51656	<i>establishment of organelle localization</i>	7,27E-06	4,20E+00	9/97 9.2%	74/5232 1.4%	SPC19 SPBC16H5.08C ASE1 CLP1 DAD2 DAD5 DAD3 ASK1 MTO1
77	<i>DNA damage checkpoint</i>	8,13E-06	4,38E+00	7/97 7.2%	41/5232 0.7%	RAD1 RAD3 HUS1 RQH1 RAD9 RAD17 RAD26
31570	<i>DNA integrity checkpoint</i>	8,17E-06	4,38E+00	8/97 8.2%	57/5232 1.0%	RAD1 RAD3 HUS1 RQH1 MIK1 RAD9 RAD17 RAD26
42770	<i>DNA damage response, signal transduction</i>	1,13E-05	4,95E+00	7/97 7.2%	43/5232 0.8%	RAD1 RAD3 HUS1 RQH1 RAD9 RAD17 RAD26
7346	<i>regulation of mitotic cell cycle</i>	1,31E-05	4,95E+00	13/97 13.4%	171/5232 3.2%	ALP14 MAL3 HUS1 MIK1 LIZ1 NUP132 PPA2 CIG2 CLP1 MPH1 POM1 MPR1 RAD26
76	<i>DNA replication checkpoint</i>	1,44E-05	4,95E+00	6/97 6.1%	30/5232 0.5%	RAD1 HUS1 MIK1 RAD9 RAD17 RAD26
32297	<i>negative regulation of DNA-dependent DNA replication initiation</i>	1,44E-05	4,95E+00	6/97 6.1%	30/5232 0.5%	RAD1 HUS1 MIK1 RAD9 RAD17 RAD26
7017	<i>microtubule based-process</i>	1,75E-05	6,21E+00	11/97 11.3%	126/5232 2.4%	ALP14 SPC19 CTF18 MAL3 ASE1 CLP1 DAD2 DAD5 DAD3 ASK1 MTO1
30174	<i>regulation of DNA-dependent DNA replication initiation</i>	1,76E-05	6,25E+00	6/97 6.1%	31/5232 0.5%	RAD1 HUS1 MIK1 RAD9 RAD17 RAD26
228	<i>nuclear chromosome</i>	1,79E-05	6,25E+00	19/97 19.5%	352/5232 6.7%	ALP14 ARP42 SPT6 RQH1 ARP8 HUS1 PHT1 HAT1 RAD9 ALP13 RAD1 SPC19 RAD3 DAD2 MPH1 DAD5 DAD3 RAD17 ASK1
8156	<i>negative regulation of DNA replication</i>	1,79E-05	6,25E+00	7/97 7.2%	46/5232 0.8%	RAD1 HUS1 MIK1 RAD9 REB1 RAD17 RAD26
19219	<i>regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process</i>	2,30E-05	6,47E+00	23/97 23.7%	494/5232 9.4%	ARP42 PXL1 SPT6 SPAC664.03 SPAC4G8.04 RQH1 HUS1 FKH2 MIK1 HAT1 RAD9 RGA8 RES2 RGA7 ALP13 RAD1 VGL1 RNC1 CBF11 SRE1 RAD26 RAD17 REB1
278	<i>mitotic cell cycle</i>	2,42E-05	6,56E+00	13/97 13.4%	181/5232 3.4%	ALP14 RQH1 FKH2 RES2 SPC19 CIG2 ASE1 CLP1 DAD2 DAD5 RAD26 ASK1 DAD3
43234	<i>protein complex</i>	2,47E-05	7,32E+00	42/97 43.2%	1268/5232 24.2%	ARP42 SPT6 MAL3 TEA4 HUS1 HAT1 SPAC3A12.13C SPAC227.05 RAD9 SPAC821.05 CTF18 ASE1 CLP1 DAD2 VPS32 MPH1 SPAC3A11.13 DAD5 DAD3 ASK1 ALP14 BOB1 PPK26 SPAC227.10 SPAC664.03 ARP8 RQH1 FKH2 PHT1 RES2 SPAC2F3.02 NUP132 ALP13 VPS8 SPC19 RAD1 SPBC3H7.03C RAD3 CPD1 SRE1 PTC2 RAD17

GO ID	Descripción	p-val	corr p-val	cluster freq	total freq	Genes
777	condensed chromosome kinetochore	2,48E-05	7,35E+00	8/97 8.2%	66/5232 1.2%	ALP14 SPC19 CLP1 DAD2 MPH1 DAD5 DAD3 ASK1
80090	regulation of primary metabolic process	2,62E-05	7,86E+00	27/97 27.8%	645/5232 12.3%	ARP42 SPC550.03C SPT6 HUS1 MIK1 HAT1 SPAC3A12.13C RAD9 SPAC821.05 VGL1 RNC1 REB1 RAD26 PXL1 SPAC664.03 RQH1 SPAC4G8.04 TIF213 FKH2 RGA8 RES2 RGA7 ALP13 RAD1 CBF11 SRE1 RAD17
51171	regulation of nitrogen compound metabolic process	2,71E-05	8,06E+00	23/97 23.7%	499/5232 9.5%	ARP42 PXL1 SPT6 SPAC664.03 SPAC4G8.04 RQH1 HUS1 FKH2 MIK1 HAT1 RAD9 RGA8 RES2 RGA7 ALP13 RAD1 VGL1 RNC1 CBF11 SRE1 RAD26 RAD17 REB1
5694	chromosome	3,09E-05	9,34E+00	21/97 21.6%	433/5232 8.2%	ALP14 ARP42 SPT6 RQH1 ARP8 HUS1 PHT1 HAT1 RAD9 ALP13 RAD1 SPC19 CTF18 RAD3 CLP1 DAD2 MPH1 DAD5 DAD3 RAD17 ASK1
44454	nuclear chromosome part	3,16E-05	9,37E+00	18/97 18.5%	334/5232 6.3%	ALP14 ARP42 SPT6 RQH1 ARP8 HUS1 PHT1 HAT1 RAD9 ALP13 RAD1 SPC19 DAD2 MPH1 DAD5 DAD3 RAD17 ASK1
776	kinetochore	3,44E-05	1,08E+01	8/97 8.2%	69/5232 1.3%	ALP14 SPC19 CLP1 DAD2 MPH1 DAD5 DAD3 ASK1
778	condensed nuclear chromosome kinetochore	3,60E-05	1,08E+01	7/97 7.2%	51/5232 0.9%	ALP14 SPC19 DAD2 MPH1 DAD5 DAD3 ASK1
51052	regulation of DNA metabolic process	4,25E-05	1,11E+01	8/97 8.2%	71/5232 1.3%	RAD1 HUS1 RQH1 MIK1 RAD9 REB1 RAD17 RAD26
35466	regulation of signaling pathway	4,34E-05	1,17E+01	9/97 9.2%	92/5232 1.7%	PXL1 RNC1 CCH1 CLP1 SPAC4G8.04 RGA8 PMR1 RGA7 PTC2
90329	regulation of DNA-dependent DNA replication	5,08E-05	1,17E+01	6/97 6.1%	37/5232 0.7%	RAD1 HUS1 MIK1 RAD9 RAD17 RAD26
779	condensed chromosome, centromeric region	5,21E-05	1,26E+01	8/97 8.2%	73/5232 1.3%	ALP14 SPC19 CLP1 DAD2 MPH1 DAD5 DAD3 ASK1
44427	chromosomal part	5,43E-05	1,80E+01	20/97 20.6%	415/5232 7.9%	ALP14 ARP42 SPT6 RQH1 ARP8 HUS1 PHT1 HAT1 RAD9 ALP13 RAD1 SPC19 CTF18 CLP1 DAD2 MPH1 DAD5 DAD3 RAD17 ASK1
6275	regulation of DNA replication	5,94E-05	1,82E+01	7/97 7.2%	55/5232 1.0%	RAD1 HUS1 MIK1 RAD9 REB1 RAD17 RAD26
780	condensed nuclear chromosome centromeric region	5,94E-05	2,40E+01	7/97 7.2%	55/5232 1.0%	ALP14 SPC19 DAD2 MPH1 DAD5 DAD3 ASK1
22403	cell cycle phase	6,50E-05	3,11E+01	17/97 17.5%	320/5232 6.1%	ALP14 MAL3 RQH1 FKH2 RES2 SPC19 CIG2 CTF18 RAD3 ASE1 CLP1 DAD2 DAD5 DAD3 RAD26 MTO1 ASK1
45786	negative regulation of cell cycle	9,40E-05	3,27E+01	7/97 7.2%	59/5232 1.1%	ALP14 CLP1 MIK1 MPH1 POM1 PPA2 NUP132
7021	tubulin complex assembly	9,64E-05	3,30E+01	4/97 4.1%	14/5232 0.2%	BOB1 SPAC227.10 SPAC3A11.13 SPAC227.05
15631	tubulin binding	1,30E-04	3,30E+01	4/97 4.1%	15/5232 0.2%	ALP14 MAL3 ASE1 MTO1
43086	negative regulation of catalytic activity	1,70E-04	3,78E+01	4/97 4.1%	16/5232 0.3%	PXL1 RNC1 CLP1 PTC2
22402	cell cycle process	1,82E-04	3,89E+01	18/97 18.5%	382/5232 7.3%	ALP14 PXL1 MAL3 RQH1 FKH2 RES2 SPC19 CIG2 CTF18 RAD3 ASE1 CLP1 DAD2 DAD5 DAD3 RAD26 MTO1 ASK1
9966	regulation of signal transduction	1,89E-04	3,89E+01	9/97 9.2%	111/5232 2.1%	PXL1 RNC1 CCH1 CLP1 SPAC4G8.04 RGA8 PMR1 RGA7 PTC2
23051	regulation of signaling process	1,89E-04	3,99E+01	9/97 9.2%	111/5232 2.1%	PXL1 RNC1 CCH1 CLP1 SPAC4G8.04 RGA8 PMR1 RGA7 PTC2
44092	negative regulation of molecular function	2,20E-04	4,04E+01	4/97 4.1%	17/5232 0.3%	PXL1 RNC1 CLP1 PTC2
10646	regulation of cell communication	2,32E-04	4,13E+01	9/97 9.2%	114/5232 2.1%	PXL1 RNC1 CCH1 CLP1 SPAC4G8.04 RGA8 PMR1 RGA7 PTC2
33036	macromolecule localization	2,32E-04	4,21E+01	23/97 23.7%	573/5232 10.9%	ALP14 PXL1 SPAC2C4.05 SST2 MAL3 TEA4 SPAC2F3.02 NUP132 VPS8 SPC19 CTF18 VGL1 ASE1 CLP1 SPC1795.10C DAD2 VPS32 MPH1 POM1 DAD5 DAD3 MTO1 ASK1

GO ID	Descripción	p-val	corr p-val	cluster freq	total freq	Genes
32991	macromolecular complex	2,42E-04	4,47E+01	49/97 50.5%	1728/5232 33.0%	SPAC227.05 SPAC3A12.13C RAD9 ASE1 CLP1 MPH1 SPAC3A11.13 RPS001 BOB1 PPK26 SPAC664.03 SPAC227.10 RQH1 ARP8 PHT1 RPL3801 NUP132 VPS8 RAD1 SPC19 RAD3 CPD1 RAD17 ARP42 MAL3 SPT6 TEA4 HUS1 HAT1 SPAC821.05 CTF18 RPS2801 SPCC825.05C VPS32 DAD2 DAD5 ASK1 DAD3 ALP14 CWF12 FKH2 RES2 SPAC2F3.02 ALP13 SPBC3H7.03C RPL502 RPS802 SRE1 PTC2
8104	protein localization	2,48E-04	4,63E+01	21/97 21.6%	500/5232 9.5%	ALP14 PXL1 SPAC2C4.05 SST2 MAL3 TEA4 SPAC2F3.02 VPS8 SPC19 CTF18 ASE1 CLP1 SPCC1795.10C DAD2 VPS32 MPH1 POM1 DAD5 DAD3 MTO1 ASK1
23052	signaling	2,58E-04	4,86E+01	17/97 17.5%	358/5232 6.8%	ALP14 PPK26 RQH1 HUS1 MIK1 RAD9 NUP132 PPA2 RAD1 RAD3 SRE1 MPH1 POM1 MPR1 PTC2 RAD26 RAD17
65008	regulation of biological quality	2,66E-04	4,86E+01	16/97 16.4%	325/5232 6.2%	ALP14 MAL3 YAM8 TEA4 RQH1 KIN1 SPC19 CTF18 CLP1 SPCC1795.10C DAD2 PMR1 POM1 DAD5 ASK1 DAD3
51783	regulation of nuclear division	2,86E-04	4,90E+01	6/97 6.1%	50/5232 0.9%	ALP14 MAL3 CBF11 MPH1 LIZ1 NUP132
60255	regulation of macromolecule metabolic process	3,00E-04	4,63E-03	23/97 23.7%	583/5232 11.1%	SPCC550.03C ARP42 SPT6 SPAC664.03 RQH1 HUS1 FKH2 TIF213 MIK1 HAT1 SPAC3A12.13C RAD9 RES2 ALP13 SPAC821.05 RAD1 VGL1 RNC1 CBF11 SRE1 RAD26 RAD17 REB1
6469	negative regulation of protein kinase activity	3,23E-04	4,86E-03	3/97 3.0%	8/5232 0.1%	RNC1 CLP1 PTC2
33673	negative regulation of kinase activity	3,23E-04	4,86E-03	3/97 3.0%	8/5232 0.1%	RNC1 CLP1 PTC2
51179	localization	3,30E-04	4,90E-03	34/97 35.0%	1044/5232 19.9%	AAP1 SPBC16H5.08C SPAC2C4.05 SPAC222.14C SST2 CCH1 MAL3 TEA4 LIZ1 VGL1 CTF18 SPAC22F8.04 DML1 ASE1 CLP1 DAD2 VPS32 MPH1 POM1 DAD5 DAD3 ASK1 MTO1 SPBPB2B2.01 ALP14 PXL1 YAM8 SPAC4G8.04 SPAC2F3.02 NUP132 VPS8 SPC19 SPCC1795.10C PMR1

**Tabla S8. Análisis funcional de la red de interacciones genéticas de *cdc2-3w* con *Gene list analyzer***

Ciclo celular (22/114)	Señalización celular (21/114)	Actividad fosfatasa (fosforilación) (5/114)	Microtúbulos (3/114)	Nucleolo (15/114)
<i>SPBC16G5.15C</i>	<i>SPAC5D6.13</i>	<i>SPBC776.02C</i>	<i>SPAC18G6.15</i>	<i>SPBP8B7.28C</i>
<i>SPBC336.03</i>	<i>SPBC336.03</i>	<i>SPAC1782.09C</i>	<i>SPAPB1A10.09</i>	<i>SPBC16C6.03C</i>
<i>SPAC18G6.15</i>	<i>SPAC13A11.01C</i>	<i>SPBC609.02</i>	<i>SPCC895.07</i>	<i>SPBC16D10.11C</i>
<i>SPAPB1A10.09</i>	<i>SPBC216.05</i>	<i>SPBC16H5.07C</i>		<i>SPAC890.05</i>
<i>SPAP14E8.02</i>	<i>SPBC725.02</i>	<i>SPCC1223.11</i>		<i>SPBC776.17</i>
<i>SPBC216.05</i>	<i>SPBC106.01</i>			<i>SPAC20G4.04C</i>
<i>SPBC725.02</i>	<i>SPAC20G4.04C</i>			<i>SPAC22F3.08C</i>
<i>SPBC106.01</i>	<i>SPAC2F7.03C</i>			<i>SPBC1539.10</i>
<i>SPAC20G4.04C</i>	<i>SPAC3C7.06C</i>			<i>SPCC613.06</i>
<i>SPBC902.02C</i>	<i>SPAPB1E7.06C</i>			<i>SPAC589.10C</i>
<i>SPAPB1E7.06C</i>	<i>SPBC23G7.08C</i>			<i>SPAC12G12.13C</i>
<i>SPAC926.03</i>	<i>SPCC1322.12C</i>			<i>SPAC1782.09C</i>
<i>SPCC895.07</i>	<i>SPAC4F10.04</i>			<i>SPAC1952.02</i>
<i>SPAPB17E12.04C</i>	<i>SPBC776.02C</i>			<i>SPBC9B6.07</i>
<i>SPCC1322.12C</i>	<i>SPAC1782.09C</i>			<i>SPBC25H2.15</i>
<i>SPBC776.02C</i>	<i>SPAC9E9.08</i>			
<i>SPAC12G12.13C</i>	<i>SPBC609.02</i>			
<i>SPAC1782.09C</i>	<i>SPBC1718.07C</i>			
<i>SPAC9E9.08</i>	<i>SPCC830.06</i>			
<i>SPBC1718.07C</i>	<i>SPBC16H5.07C</i>			
<i>SPBC16H5.07C</i>	<i>SPAC664.07C</i>			
<i>SPAC9E9.13</i>	<i>SPCC1223.11</i>			
<i>SPAC664.07C</i>	<i>SPAC14C4.13</i>			
<i>SPAC14C4.13</i>				

Tabla S9. Análisis funcional de la red de interacciones genéticas de *cdc2-3w* con BiNGO

GO ID	Descripción	p-val	corr p-val	cluster freq	total freq	Genes
75	<i>cell cycle checkpoint</i>	6,13E-10	6,42E-07	14/89 15.7%	98/5232 1.8%	ALP14 HUS1 EME1 ZFS1 RAD9 CID14 DIS2 RAD3 ASE1 CLP1 BUB1 MPH1 RAD26 RAD17
51726	<i>regulation of cell cycle</i>	2,97E-08	1,55E-05	20/89 22.4%	282/5232 5.3%	ALP14 MAL3 HUS1 EME1 ZFS1 RAD9 PPA2 CID14 DIS2 EFC25 RAD3 ASE1 CLP1 BUB1 MPH1 POM1 WOS2 MPR1 RAD26 RAD17
31573	<i>intra-S-DNA damage checkpoint</i>	9,05E-08	3,16E-05	6/89 6.7%	15/5232 0.2%	RAD3 EME1 HUS1 RAD9 RAD17 RAD26
7346	<i>regulation of mitotic cell cycle</i>	1,30E-07	3,41E-05	15/89 16.8%	171/5232 3.2%	ALP14 MAL3 HUS1 ZFS1 PPA2 CID14 DIS2 EFC25 CLP1 BUB1 MPH1 POM1 WOS2 MPR1 RAD26
23052	<i>signaling</i>	1,49E-06	3,11E-04	20/89 22.4%	358/5232 6.8%	ALP14 SPAC5D6.13 HUS1 EME1 ZFS1 RAD9 PPA2 CID14 DIS2 PTN1 EFC25 RAD3 PIT1 BUB1 MPH1 POM1 PTC2 MPR1 RAD26 RAD17
7165	<i>signal transduction</i>	2,74E-06	3,58E-04	19/89 21.3%	339/5232 6.4%	ALP14 HUS1 EME1 ZFS1 RAD9 PPA2 CID14 DIS2 PTN1 EFC25 RAD3 PIT1 BUB1 MPH1 POM1 PTC2 MPR1 RAD26 RAD17
23060	<i>signal transduction</i>	2,74E-06	3,58E-04	19/89 21.3%	339/5232 6.4%	ALP14 HUS1 EME1 ZFS1 RAD9 PPA2 CID14 DIS2 PTN1 EFC25 RAD3 PIT1 BUB1 MPH1 POM1 PTC2 MPR1 RAD26 RAD17
23046	<i>signaling process</i>	2,74E-06	3,58E-04	19/89 21.3%	339/5232 6.4%	ALP14 HUS1 EME1 ZFS1 RAD9 PPA2 CID14 DIS2 PTN1 EFC25 RAD3 PIT1 BUB1 MPH1 POM1 PTC2 MPR1 RAD26 RAD17
77	<i>DNA damage checkpoint</i>	4,57E-06	5,31E-04	7/89 7.8%	41/5232 0.7%	DIS2 RAD3 EME1 HUS1 RAD9 RAD17 RAD26
45786	<i>negative regulation of cell cycle</i>	5,57E-06	5,83E-04	8/89 8.9%	59/5232 1.1%	CID14 ALP14 CLP1 BUB1 ZFS1 MPH1 POM1 PPA2
42770	<i>DNA damage response, signal transduction</i>	6,37E-06	6,05E-04	7/89 7.8%	43/5232 0.8%	DIS2 RAD3 EME1 HUS1 RAD9 RAD17 RAD26
7093	<i>mitotic cell cycle checkpoint</i>	7,47E-06	6,32E-04	7/89 7.8%	44/5232 0.8%	CID14 ALP14 HUS1 BUB1 ZFS1 MPH1 RAD26
10564	<i>regulation of cell cycle process</i>	7,86E-06	6,32E-04	10/89 11.2%	103/5232 1.9%	CID14 ALP14 DIS2 MAL3 CLP1 BUB1 ZFS1 MPH1 POM1 MPR1
7088	<i>regulation of mitosis</i>	1,36E-05	1,01E-03	7/89 7.8%	48/5232 0.9%	CID14 ALP14 DIS2 MAL3 BUB1 ZFS1 MPH1
51783	<i>regulation of nuclear division</i>	1,79E-05	1,25E-03	7/89 7.8%	50/5232 0.9%	CID14 ALP14 DIS2 MAL3 BUB1 ZFS1 MPH1
31570	<i>DNA integrity checkpoint</i>	4,31E-05	2,82E-03	7/89 7.8%	57/5232 1.0%	DIS2 RAD3 EME1 HUS1 RAD9 RAD17 RAD26
7094	<i>mitotic cell cycle spindle assembly checkpoint</i>	9,18E-05	4,40E-03	5/89 5.6%	28/5232 0.5%	CID14 ALP14 BUB1 ZFS1 MPH1
8608	<i>attachment of spindle microtubules</i>	9,18E-05	4,40E-03	5/89 5.6%	28/5232 0.5%	ALP14 CTF18 MAL3 CLP1 BUB1
71173	<i>attachment to kinetochore</i>	9,18E-05	4,40E-03	5/89 5.6%	28/5232 0.5%	CID14 ALP14 BUB1 ZFS1 MPH1
71174	<i>spindle assembly checkpoint</i>	9,18E-05	4,40E-03	5/89 5.6%	28/5232 0.5%	CID14 ALP14 BUB1 ZFS1 MPH1
32507	<i>maintenance of protein location in cell</i>	9,19E-05	4,40E-03	7/89 7.8%	64/5232 1.2%	ALP14 CTF18 SPCC1840.08C MAL3 CLP1 SPCC1795.10C BUB1
45185	<i>maintenance of protein location</i>	1,02E-04	4,40E-03	7/89 7.8%	65/5232 1.2%	ALP14 CTF18 SPCC1840.08C MAL3 CLP1 SPCC1795.10C BUB1
45841	<i>negative regulation of mitotic metaphase/anaphase</i>	1,09E-04	4,40E-03	5/89 5.6%	29/5232 0.5%	CID14 ALP14 BUB1 ZFS1 MPH1
45839	<i>negative regulation of mitosis</i>	1,09E-04	4,40E-03	5/89 5.6%	29/5232 0.5%	CID14 ALP14 BUB1 ZFS1 MPH1
31577	<i>spindle checkpoint</i>	1,09E-04	4,40E-03	5/89 5.6%	29/5232 0.5%	CID14 ALP14 BUB1 ZFS1 MPH1
51784	<i>negative regulation of nuclear division</i>	1,09E-04	4,40E-03	5/89 5.6%	29/5232 0.5%	CID14 ALP14 BUB1 ZFS1 MPH1
51651	<i>maintenance of location in cell</i>	1,23E-04	4,78E-03	7/89 7.8%	67/5232 1.2%	ALP14 CTF18 SPCC1840.08C MAL3 CLP1 SPCC1795.10C BUB1

Tabla S10. Caracterización comprensiva de los mutantes interactuantes con *wee1-50*

Nombre ORF	Nombre Gen	Morf. YES	Morf. MM	Citología YES	Citología MM	Ciclo YES	Ciclo MM	Nombre ORF	Nombre Gen	Morf. YES	Morf. MM	Citología YES	Citología MM	Ciclo YES	Ciclo MM
SPBC216.05	<i>rad3</i>	0,1	0,1	0	0	0	0	SPBC1D7.01	<i>SPBC1D7.01</i>	0,4	0	0	0	0	0
SPAC9E9.08	<i>rad26</i>	0	0	0	0	0	2	SPAC25H1.07	<i>emc1</i>	0	1	0	0	4	0
SPAC14C4.13	<i>rad17</i>	0	0	0	0	0	0	SPAC227.10	<i>SPAC227.10</i>	0,4	0,1,4	0,3	0,3	0	0
SPAC664.07c	<i>rad9</i>	0	0	0	0	0	0	SPAC4F10.02	<i>aap1</i>	0,1,3	0,1,3	0	0	0	0
SPAC20G4.04c	<i>hus1</i>	0	0	0	0	3,4	0	SPAC227.05	<i>SPAC227.05</i>	0	0	0	0	0	0
SPAC1952.07	<i>rad1</i>	0	0	0	0	0	0	SPBC3E7.09	<i>SPBC3E7.09</i>	0	0	0	0	0	0
SPBC902.02c	<i>ctf18</i>	5	5	0	0	0	0	SPBC15C4.01c	<i>oca3</i>	0	0	0	0	0	0
SPAC31A2.15c	<i>dcc1</i>	0	1	0,2,3	0,2,3	0	0	SPAC6F6.01	<i>cch1</i>	0,2	0,2	0,3,8	0,3,8	0	0
SPAC664.03	<i>SPAC664.03</i>	0,1	1	0,2	0,4	3,4	0	SPAC1F5.08c	<i>yam8</i>	0	0	0	0	0	0
SPBC530.05	<i>SPBC530.05</i>	0	1	0	0	3	3	SPBC31E1.02c	<i>pmr1</i>	0,1	0,1	0	0	0	0
SPBC16G5.15c	<i>fkh2</i>	1	1	0,2,3	0	2	2	SPCC830.06	<i>cnb1</i>	3,6	3,6	8,7	8,7	0	0
SPAC1F7.01c	<i>spt6</i>	0	0,1	0	0	0	0	SPBC25B2.10	<i>SPBC25B2.10</i>	5	5	0,3	0,3	0	0
SPCC736.08	<i>cbf11</i>	0,1,3	0,1	0	<b>0,2,3</b>	0	0	SPCC757.09c	<i>rnc1</i>	0	1	0	0	0	3
SPAC1142.08	<i>fhl1</i>	0	0	0	0	0	2	SPCC1223.11	<i>ptc2</i>	0,1	1	0	0	0	0
SPAC3H1.11	<i>hsr1</i>	0,1	0,1	0	0	0	0	SPBC1685.01	<i>pmp1</i>	0	0	0,3	0,3	0	0
SPBC25H2.15	<i>SPBC25H2.15</i>	4	0	0	0	0	3	SPAC11G7.06c	<i>mug132</i>	0	0	0,3	0,3	0	0
SPBC1539.10	<i>nop16</i>	0,1	1	0	0	2	0	SPCC553.01c	<i>SPCC553.01c</i>	0	0,3	0,3	0,3	0	0
SPBC776.17	<i>SPBC776.17</i>	0	0	0,5	0,5	0	0	SPAC2F3.02	<i>SPAC2F3.02</i>	5	5	0	0	0	0
SPAC140.02	<i>gar2</i>	0,1	0,1	0	0	0	3	SPAC22F8.04	<i>SPAC22F8.04</i>	0,1	0,1	0,3	0,3	0	0
SPAC3H5.12c	<i>rpl501</i>	0,1	0,1	0,5	0,5	0	0	SPAC222.14c	<i>SPAC222.14c</i>	0	0	3	0	0	0
SPBC3B9.13c	<i>rpp102</i>	0	0,1	0	0	0	0	SPAC17A5.08	<i>SPAC17A5.08</i>	5	5	0	0	0	3
SPAPB1A10.09	<i>ase1</i>	0	0	3	3	0	0	SPBC18H10.19	<i>vps8</i>	0	0	0	0	0	0
SPCC1223.15c	<i>spc19</i>	3	0	<b>3,5</b>	<b>3,5</b>	4	3,4	SPAC4G8.04	<i>SPAC4G8.04</i>	0,1	0,1	0,3,7	0,3,7	0	0
SPAC18G6.15	<i>mal3</i>	4	4	0,3	0,3	3,4	2	SPCC794.11c	<i>SPCC794.11c</i>	0	0,1	3	3	0	1
SPBC106.01	<i>mph1</i>	5	5	0,3	0,3	0	0	SPAC823.05c	<i>tlg2</i>	0	0	3	3	0	3
SPBC27.02c	<i>ask1</i>	0,3	0,1	0,3,5	<b>3,5</b>	4	4	SPAC631.02	<i>nrc1</i>	5	5	3	3	0	0
SPCC895.07	<i>alp14</i>	4	4	<b>3,5</b>	3,5	4	0	SPAC31G5.18c	<i>sde2</i>	0,1	0,1,6	0	0	0	3
SPAC14C4.16	<i>dad3</i>	6,7	6	<b>3,5</b>	<b>3,5</b>	0	2	SPAC664.02c	<i>arp8</i>	0	0	0	0	0	3
SPAC1805.07c	<i>dad2</i>	6	0,2	<b>5,3</b>	<b>5,3</b>	4	4	SPBP8B7.28c	<i>stc1</i>	0	0,1	0	0	0	0
SPBC32F12.08c	<i>duo1</i>	0,1,4	6,2	<b>5,7</b>	<b>5,7</b>	4	3,4	SPBC11B10.10c	<i>pht1</i>	5	5	8,3,6	8,3,6	0	0
SPCC417.02	<i>dad5</i>	0,6	0	<b>5,4</b>	<b>5,7,4</b>	0	1	SPAC139.06	<i>hat1</i>	0,1	0,1	0	0	0	0
SPBC2D10.16	<i>mhf1</i>	5	5	<b>1,5,3</b>	<b>1,5,3</b>	3,4	3,4	SPBC29A3.05	<i>vps71</i>	5	5	3,7	3,7	4	0
SPCC576.12c	<i>mhf2</i>	5	5	<b>1,3,9</b>	<b>1,3,9</b>	0	3	SPAC25A8.01c	<i>fft3</i>	0,1	0,1	0	0	0	0
SPBC342.05	<i>crb2</i>	0,2	0	0	0,4	0	0	SPAC23D3.09	<i>arp42</i>	0,2	5	0	0	0	0
SPAC3H8.05c	<i>SPAC3H8.05c</i>	0,7	0,7	4,7	4,7	3,4	4	SPAC31G5.19	<i>SPAC31G5.19</i>	0,2	5	3,8	3,8	0	0
SPAC1071.02	<i>mms19</i>	0,1	1	0	0,6	0	3	SPAC10F6.08c	<i>nht1</i>	0	0,1	0,3,8	0,3,8	0	0
SPBC354.10	<i>def1</i>	0	0	0	0	0	3	SPBC660.14	<i>mik1</i>	5	0,1	0	0	0	0
SPAPB1E7.06c	<i>eme1</i>	0	0	0	0	0	0	SPAC1782.05	<i>ypa2</i>	1,6	1,6	0	0	3	0
SPBC36.06c	<i>spo9</i>	0	0	0,3	0	3	0	SPBC17A3.06	<i>pi040</i>	0,1	0,1	0	0	0	0

Nombre ORF	Nombre Gen	Morf. YES	Morf. MM	Citología YES	Citología MM	Ciclo YES	Ciclo MM	Nombre ORF	Nombre Gen	Morf. YES	Morf. MM	Citología YES	Citología MM	Ciclo YES	Ciclo MM
SPAC13A11.01c	<i>rga8</i>	0	0	0	0	0	0	SPAC1782.09c	<i>clp1</i>	5	5	9	9	3	0
SPAC2F7.03c	<i>pom1</i>	1,4	1,4	3,9	3,9	0	0	SPCC550.14	<i>vgl1</i>	5	5	0	0	0	0
SPBC4F6.06	<i>kin1</i>	3	3	8	8	0	0	SPAC3A12.13c	SPAC3A12.13c	1,6	1,6	0	0	0	0
SPBC4F6.12	<i>pxl1</i>	3,6	3,6	<b>8,9</b>	<b>8,9</b>	0	0	SPBC17G9.09	<i>tif213</i>	0,1,6	0,1,6	0	0	0	0
SPBC1706.01	<i>tea4</i>	0,4	0,4	0	0	0	0	SPAC9G1.12	<i>cpd1</i>	0,1	0,1	0	0	0	0
SPCC1223.06	<i>tea1</i>	4	4	0	0	0	3	SPBC11C11.09c	<i>rpl502</i>	0,1	0,1	0	0	0	0
SPAC1486.04c	<i>alm1</i>	1	0,1	6	6	0	0	SPAC31A2.02	<i>trm112</i>	0,1,6	6	0	0	0	0
SPBC83.18c	<i>fic1</i>	0,1,6	0,1,6	0,3,7	0,3,7	0	0	SPBC32F12.05c	<i>cwf12</i>	0,1	0,1	<b>8,3</b>	<b>8,3</b>	0	0
SPAC4G8.05	<i>ppk14</i>	0,1	0,1	0,3	0	0	0	SPAC23C11.10	<i>mpn1</i>	0,2	2	0,8	0,8	3	3
SPBC947.01	<i>alf1</i>	0,1	5	3,8	3	0	3	SPCC550.03c	SPCC550.03c	0,1	0,1	0	0	0	0
SPCC417.07c	<i>mto1</i>	0,4	0,4	0	0	0	0	SPCC663.11	<i>saf1</i>	5	5	<b>3,6</b>	<b>3,6</b>	0	0
SPAC19B12.10	<i>sst2</i>	0	0	0	0	0	0	SPBC336.14c	<i>ppk26</i>	0,1	0,1	0	0	0	0
SPAC1071.04c	<i>spc2</i>	0,1	0,1	0	0	0	0	SPCC74.02c	SPCC74.02c	0,1	5	3,8,9	3,8,9	3,4	0
SPAC1783.02c	<i>vps66</i>	0,6	0,6	0	0	0	0	SPBP35G2.14	SPBP35G2.14	0,1,6	0,1,6	0,3	0,3	0	0
SPAC3H1.05	SPAC3H1.05	0	0	0	0	2	0	SPBC56F2.08c	SPBC56F2.08c	0,1	0,1	0,3,6,9	0,3,6,9	0	0
SPCC1795.10c	SPCC1795.10c	0	0	0,3	0,3	0	0	SPAC1093.01	<i>ppr5</i>	0	0,1	3	0	0	0
SPAC1834.05	<i>alg9</i>	0,1	0	0	0	4	0	SPCC1682.08c	SPCC1682.08c	0,1	0,1	0,3	0	0	0
SPBC3H7.09	<i>erf2</i>	0,2,3	0,2,3	0	0	0	0	SPAC1610.01	SPAC1610.01	5	0,6	<b>2,6</b>	<b>2,6</b>	3,4	0
SPBC342.01c	<i>alg6</i>	0	0	0,2	0,2,5	3,4	0	SPAC1B1.04c	SPAC1B1.04c	0,1	5	0	0	0	1
SPBC56F2.10c	<i>alg5</i>	0,1	0,1	0	0	0	0	SPCC1919.05	<i>ski3</i>	0,1,6	0,1,6	0,3	0	0	0
SPAC4F8.01	<i>did4</i>	0,1	0,1	0,3	0,3	4	1	SPAC1805.04	<i>nup132</i>	0,6	0,6	0,3	0	0	0
SPAC5D6.13	SPAC5D6.13	0	0	0	0	0	0	SPBC2G2.01c	<i>liz1</i>	0	0	2,3,8	2,3	3,4	0
SPAC17C9.07	<i>alg8</i>	0	0	0	0	3,4	0	SPBC725.15	<i>ura5</i>	0,1,6	0,1,6	0,3	0,3	0	0
SPBPJ4664.06	<i>gpt1</i>	0,1	1	0,2,3	0,2,3	0	0	SPBC337.15c	<i>coq7</i>	0,1	1	0	0	0	1
SPBC1734.12c	<i>alg12</i>	0	0	0	0	0	0	SPBPB2B2.14c	SPBPB2B2.14c	0,1,6	2	0,3	0	0	1
SPAC6B12.07c	SPAC6B12.07c	0,1	1	0,3,6	0,3,6	0	0	SPAC22E12.18	SPAC22E12.18	0,1	0,1	0,3	0	0	0
SPBC215.02	<i>bob1</i>	0,4	0,4	0	0	0	0	SPAC7D4.12c	SPAC7D4.12c	0	0	3	0	0	0
SPAC3H8.07c	<i>pac10</i>	0,3	0,3	0	0	2	0	SPCC1494.08c	SPCC1494.08c	0,1	1	0	0	0	0
SPAC3A11.13	SPAC3A11.13	0	0	0	0	4	0	SPCC594.01	SPCC594.01	0,1	0,1	0,3	0,3	0	0

Tabla S11. Caracterización comprensiva de los mutantes interactuantes con *cdc2-3w*

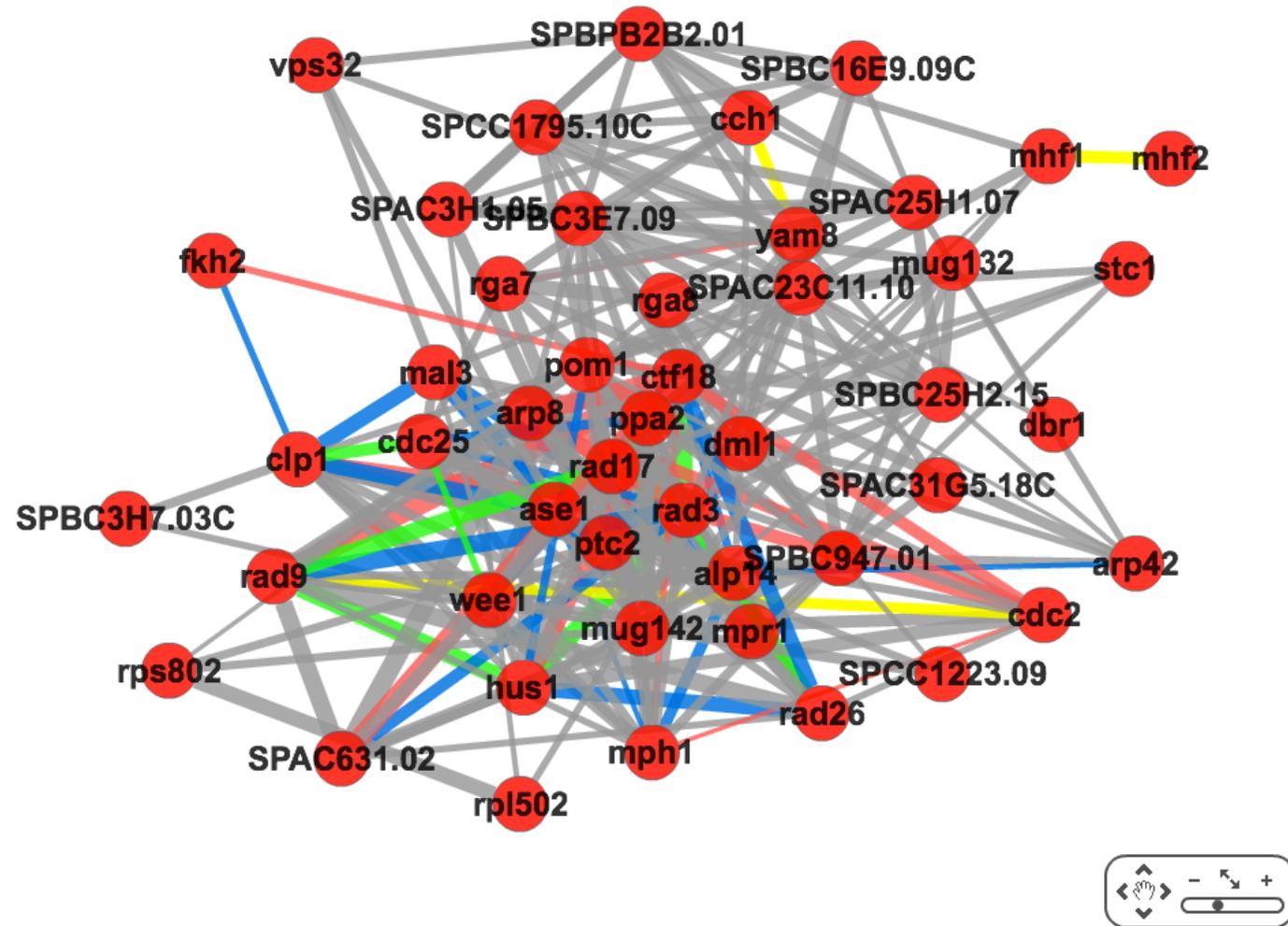
Nombre ORF	Nombre Gen	Morf. YES	Morf. MM	Citología YES	Citología MM	Ciclo YES	Ciclo MM	Nombre ORF	Nombre Gen	Morf. YES	Morf. MM	Citología YES	Citología MM	Ciclo YES	Ciclo MM
SPBC15C4.05	SPBC15C4.05	0,1,6	1	0,3,6	0,3,6	0	0	SPBC16E9.09c	SPBC16E9.09c	0,1	0,1	0,3	0,3	3	7
SPAC1D4.09c	rtf2	0,1	0,1	0,3	0,3	0	0	SPBC16E9.14c	zrg17	0,1	0,1	0,3,6	0,3	0	0
SPAC8E11.02c	rad24	1	1	0	0	0	1,2	SPBC887.18c	hfi1	0,4,1	0,4,1	3	0,3	0	0
SPAP14E8.02	tos4	0,4	0,2	0	0	1	1	SPAC12G12.13c	cid14	0,1,6	0,1,6	0,3	0,3	6	1
SPBC16C6.03c	SPBC16C6.03c	0,1	0,1,6	0,3	0	0	0	SPAC4F10.04	ypa1	5	5	3	3,8	0	1
SPAC22F3.08c	rok1	0,1,6	0,1,6	0,3	0,3	0	0	SPAC30D11.04c	nup124	0,4	0	0,3	0,3	0	0
SPAC890.05	SPAC890.05	0,1,6	0,1,6	0,3	0,3	0	0	SPCC1682.12c	ubp16	1	1	0	0	0	1
SPBP8B7.06	rpp201	0,1,6	0,1,6	0,3	0,3	0	0	SPBC215.03c	csn1	5	5	0,3	0,3	4	4
SPBC16D10.11c	rps1801	0,1,6	0,1	0,3	0	0	0	SPAPB17E12.04c	csn2	5	5	0,3	0,3	4	4
SPBC1703.03c	SPBC1703.03c	0,1,6	0,1,6	0,3	0,3	0	0	SPCC1840.08c	SPCC1840.08c	0,1,6	1,6	0,3,8	0,8	0	7
SPBP16F5.05c	SPBP16F5.05c	5	0,1,6	0,3	0,3	3	1	SPAC922.07c	atd2	0,1,6	1,2	0,3	0,3	0	1
SPBC685.06	rps001	0,1,6	0,1,6	0,3	0,3	0	2	SPAC19G12.08	scs7	0,1,6	0,1,6	0	0	0	1
SPBP35G2.03c	sgo1	0,6	0,6	0	0	0	1,2	SPCC1235.15	dga1	1,6	1,6	0	0	0	1,2
SPAC20H4.07	rhp57	0,1,6	0,1,6	0,3	0,2	3	3	SPCC1739.14	npp106	1,2,6	1,2,6	<b>3,6</b>	<b>3,6</b>	2	2
SPAC926.03	rlc1	3,6,2	3,6,2	8,9	8,9	7	7	SPBC1718.07c	zfs1	0,6	1,6	0,6	0,6	0	1
SPAC1142.07c	vps32	0,1,6	0,1,6	0	0	0	1,2	SPBC32F12.02	rec14	1	1	0,3	0,3	0	0
SPAC14C4.06c	SPAC14C4.06c	0,1	0,1	<b>2,6,9</b>	0,6,9	0	0	SPAC3A12.12	atp11	0,1	2,3	0	8	0	7
SPCC825.05c	SPCC825.05c	0,1,6	0,1,6	3	3	3,4	1	SPBC12C2.04	SPBC12C2.04	5	5	0,3	0	0	3
SPAC3G9.04	ssu72	0,1	1	0,3	0	0	1,2	SPCC1739.10	mug33	0,1,6	0,1,6	0,3	0,3	3	0
SPAC17A5.02c	dbr1	5	5	0,3	0,3,8	3,4	3,4	SPCC24B10.18	SPCC24B10.18	5	5	0,6	0,3	0	0
SPBC18H10.10c	saf4	5	5	0,3	0,3	0	0	SPBC9B6.03	SPBC9B6.03	0,1	0,1,6	0,3	0	0	1
SPBC31F10.12	tma20	0,1	1	0	0,7	0	0	SPAC4F10.19c	SPAC4F10.19c	0,4,6	0,4,6	0	0	0	0
SPAC3C7.06c	pit1	5	5	0	0	3	0	SPAC977.05c	SPAC977.05c	0,1,6	0,1,6	0	0	0	0
SPAC23H3.06	apl6	0,4	1	0,3	0,3	0	0	SPBC1604.03c	SPBC1604.03c	0,1,6	0,1,6	0,6	0,6	0	3
SPCP1E11.06	apl4	0,1	1	0,3	0,3,6	0	0								

**Tabla S12. Parejas de interacciones predichas por Plnt entre los genes comunes identificados en la red de interacciones genéticas negativas con *wee1-50* y *cdc2-3w***

Nombre Gen 1	Nombre Gen 2	RF	SVM	Nombre Gen 1	Nombre Gen 2	RF	SVM	Nombre Gen 1	Nombre Gen 2	RF	SVM
<i>mal3</i>	<i>ase1</i>	0.637	0,980	<i>SPAC25H1.07</i>	<i>SPBC3E7.09</i>	0.55	0,759	<i>SPAC23C11.10</i>	<i>ptc2</i>	0.542	0,651
<i>SPAC631.02</i>	<i>arp8</i>	0.717	0,966	<i>SPBPB2B2.01</i>	<i>SPCC1795.10C</i>	0.544	0,759	<i>mal3</i>	<i>mug142</i>	0.503	0,649
<i>ase1</i>	<i>alp14</i>	0.678	0,953	<i>SPAC25H1.07</i>	<i>pom1</i>	0.533	0,756	<i>ppa2</i>	<i>ptc2</i>	0.556	0,648
<i>rad9</i>	<i>ctf18</i>	0.78	0,950	<i>SPBC3E7.09</i>	<i>SPBC947.01</i>	0.548	0,756	<i>cdc25</i>	<i>rad3</i>	0.57	0,647
<i>SPAC631.02</i>	<i>ctf18</i>	0.729	0,948	<i>mal3</i>	<i>ppa2</i>	0.529	0,756	<i>vps32</i>	<i>yam8</i>	0.536	0,644
<i>mal3</i>	<i>alp14</i>	0.579	0,939	<i>pom1</i>	<i>rad3</i>	0.58	0,755	<i>SPAC23C11.10</i>	<i>mug142</i>	0.545	0,644
<i>rad9</i>	<i>rad3</i>	0.688	0,926	<i>cdc2</i>	<i>ppa2</i>	0.569	0,754	<i>arp8</i>	<i>SPBC3E7.09</i>	0.522	0,642
<i>rad17</i>	<i>rad3</i>	0.737	0,925	<i>mug132</i>	<i>SPAC23C11.10</i>	0.581	0,753	<i>cdc25</i>	<i>mug142</i>	0.56	0,642
<i>hus1</i>	<i>rad3</i>	0.682	0,924	<i>ctf18</i>	<i>wee1</i>	0.6	0,751	<i>rad17</i>	<i>cdc2</i>	0.568	0,641
<i>arp8</i>	<i>ctf18</i>	0.78	0,919	<i>yam8</i>	<i>SPBPB2B2.01</i>	0.647	0,750	<i>yam8</i>	<i>SPAC23C11.10</i>	0.517	0,641
<i>SPAC631.02</i>	<i>rad9</i>	0.721	0,917	<i>arp8</i>	<i>cdc2</i>	0.602	0,746	<i>arp42</i>	<i>SPAC25H1.07</i>	0.501	0,637
<i>arp8</i>	<i>rad9</i>	0.748	0,915	<i>clp1</i>	<i>mph1</i>	0.63	0,745	<i>dml1</i>	<i>cch1</i>	0.517	0,636
<i>rga8</i>	<i>rga7</i>	0.602	0,913	<i>pom1</i>	<i>SPBC947.01</i>	0.593	0,745	<i>mug132</i>	<i>pom1</i>	0.571	0,636
<i>rad3</i>	<i>ctf18</i>	0.745	0,905	<i>SPBC16E9.09C</i>	<i>SPBPB2B2.01</i>	0.593	0,741	<i>dml1</i>	<i>rpl502</i>	0.519	0,635
<i>rad17</i>	<i>rad26</i>	0.752	0,899	<i>vps32</i>	<i>ase1</i>	0.542	0,741	<i>rad3</i>	<i>wee1</i>	0.512	0,634
<i>ppa2</i>	<i>mug142</i>	0.657	0,893	<i>rad17</i>	<i>cdc25</i>	0.619	0,739	<i>mpr1</i>	<i>SPBC947.01</i>	0.623	0,634
<i>clp1</i>	<i>ptc2</i>	0.624	0,888	<i>arp8</i>	<i>rad26</i>	0.717	0,739	<i>yam8</i>	<i>SPBC25H2.15</i>	0.55	0,633
<i>hus1</i>	<i>ctf18</i>	0.742	0,885	<i>SPAC25H1.07</i>	<i>rga7</i>	0.592	0,737	<i>rad9</i>	<i>alp14</i>	0.58	0,630
<i>SPAC3H1.05</i>	<i>mug142</i>	0.538	0,883	<i>mal3</i>	<i>cdc25</i>	0.535	0,736	<i>hus1</i>	<i>alp14</i>	0.6	0,628
<i>arp8</i>	<i>rad3</i>	0.69	0,883	<i>rad17</i>	<i>arp8</i>	0.689	0,734	<i>rga8</i>	<i>SPBC25H2.15</i>	0.54	0,627
<i>cdc25</i>	<i>ptc2</i>	0.594	0,882	<i>cdc25</i>	<i>ppa2</i>	0.515	0,734	<i>yam8</i>	<i>dml1</i>	0.537	0,625
<i>hus1</i>	<i>rad9</i>	0.736	0,870	<i>arp42</i>	<i>rga7</i>	0.594	0,732	<i>rad17</i>	<i>stc1</i>	0.547	0,623
<i>cdc2</i>	<i>rad3</i>	0.584	0,867	<i>pom1</i>	<i>wee1</i>	0.606	0,730	<i>mpr1</i>	<i>wee1</i>	0.551	0,623
<i>clp1</i>	<i>mal3</i>	0.601	0,864	<i>SPBC25H2.15</i>	<i>ptc2</i>	0.54	0,729	<i>rga8</i>	<i>dml1</i>	0.585	0,621
<i>rad9</i>	<i>rad26</i>	0.737	0,861	<i>rad3</i>	<i>SPBC3E7.09</i>	0.501	0,728	<i>mug132</i>	<i>dml1</i>	0.505	0,620
<i>yam8</i>	<i>SPBC16E9.09C</i>	0.64	0,859	<i>mug142</i>	<i>SPCC1795.10C</i>	0.562	0,727	<i>mph1</i>	<i>mug142</i>	0.53	0,617
<i>rga7</i>	<i>ptc2</i>	0.556	0,852	<i>pom1</i>	<i>ase1</i>	0.601	0,724	<i>SPBC3E7.09</i>	<i>ctf18</i>	0.518	0,615
<i>hus1</i>	<i>arp8</i>	0.669	0,850	<i>mug132</i>	<i>mug142</i>	0.561	0,724	<i>SPBC3H7.03C</i>	<i>wee1</i>	0.533	0,615
<i>SPAC3H1.05</i>	<i>SPCC1795.10C</i>	0.565	0,848	<i>pom1</i>	<i>alp14</i>	0.623	0,724	<i>SPAC3H1.05</i>	<i>cch1</i>	0.518	0,615
<i>clp1</i>	<i>ase1</i>	0.62	0,848	<i>yam8</i>	<i>cch1</i>	0.607	0,720	<i>mal3</i>	<i>yam8</i>	0.516	0,613
<i>rad17</i>	<i>rad9</i>	0.692	0,847	<i>rga8</i>	<i>SPAC23C11.10</i>	0.536	0,715	<i>SPAC23C11.10</i>	<i>stc1</i>	0.565	0,610
<i>cch1</i>	<i>SPBC16E9.09C</i>	0.554	0,841	<i>cch1</i>	<i>rga7</i>	0.558	0,715	<i>arp42</i>	<i>dml1</i>	0.559	0,604
<i>rad17</i>	<i>hus1</i>	0.718	0,839	<i>SPAC25H1.07</i>	<i>SPBPB2B2.01</i>	0.547	0,713	<i>hus1</i>	<i>pom1</i>	0.608	0,603
<i>pom1</i>	<i>ppa2</i>	0.579	0,838	<i>rad9</i>	<i>wee1</i>	0.575	0,713	<i>pom1</i>	<i>rad9</i>	0.57	0,603
<i>hus1</i>	<i>rad26</i>	0.684	0,837	<i>rad17</i>	<i>pom1</i>	0.617	0,712	<i>pom1</i>	<i>rad26</i>	0.523	0,602
<i>clp1</i>	<i>wee1</i>	0.649	0,835	<i>SPAC23C11.10</i>	<i>SPCC1795.10C</i>	0.546	0,711	<i>ctf18</i>	<i>alp14</i>	0.591	0,599
<i>ppa2</i>	<i>wee1</i>	0.536	0,830	<i>mug142</i>	<i>wee1</i>	0.52	0,711	<i>ppa2</i>	<i>mpr1</i>	0.552	0,598
<i>mph1</i>	<i>ppa2</i>	0.549	0,825	<i>cch1</i>	<i>SPBC3E7.09</i>	0.572	0,710	<i>ase1</i>	<i>mph1</i>	0.506	0,597
<i>ppa2</i>	<i>rad3</i>	0.506	0,822	<i>arp42</i>	<i>SPBC947.01</i>	0.575	0,708	<i>yam8</i>	<i>ase1</i>	0.521	0,597
<i>SPAC23C11.10</i>	<i>pom1</i>	0.563	0,818	<i>SPAC23C11.10</i>	<i>ppa2</i>	0.515	0,708	<i>arp42</i>	<i>alp14</i>	0.508	0,595

Nombre Gen 1	Nombre Gen 2	RF	SVM	Nombre Gen 1	Nombre Gen 2	RF	SVM	Nombre Gen 1	Nombre Gen 2	RF	SVM
<i>clp1</i>	<i>rad3</i>	0.576	0,817	<i>hus1</i>	<i>SPAC631.02</i>	0.575	0,708	<i>pom1</i>	<i>ctf18</i>	0.585	0,593
<i>SPAC3H1.05</i>	<i>SPBC3E7.09</i>	0.536	0,816	<i>SPAC23C11.10</i>	<i>SPBPB2B2.01</i>	0.539	0,707	<i>SPAC25H1.07</i>	<i>SPBC16E9.09C</i>	0.55	0,592
<i>cch1</i>	<i>SPBPB2B2.01</i>	0.642	0,815	<i>mph1</i>	<i>SPBC947.01</i>	0.523	0,705	<i>dml1</i>	<i>SPBC25H2.15</i>	0.593	0,589
<i>pom1</i>	<i>SPBC3E7.09</i>	0.553	0,815	<i>SPAC25H1.07</i>	<i>SPAC3H1.05</i>	0.528	0,705	<i>cdc25</i>	<i>rad26</i>	0.595	0,588
<i>SPAC631.02</i>	<i>SPBC947.01</i>	0.627	0,814	<i>SPBC3E7.09</i>	<i>SPBPB2B2.01</i>	0.525	0,705	<i>cdc25</i>	<i>wee1</i>	0.547	0,579
<i>ase1</i>	<i>wee1</i>	0.548	0,811	<i>rga8</i>	<i>SPCC1795.10C</i>	0.507	0,704	<i>SPAC23C11.10</i>	<i>SPBC16E9.09C</i>	0.528	0,576
<i>rad17</i>	<i>SPAC23C11.10</i>	0.549	0,810	<i>vps32</i>	<i>mal3</i>	0.549	0,701	<i>mug132</i>	<i>dbr1</i>	0.52	0,573
<i>pom1</i>	<i>SPBC25H2.15</i>	0.581	0,807	<i>clp1</i>	<i>mug142</i>	0.556	0,700	<i>SPBC25H2.15</i>	<i>mug142</i>	0.506	0,570
<i>rad26</i>	<i>rad3</i>	0.602	0,806	<i>cdc2</i>	<i>ctf18</i>	0.656	0,700	<i>dml1</i>	<i>alp14</i>	0.576	0,568
<i>SPAC631.02</i>	<i>rad3</i>	0.565	0,806	<i>ase1</i>	<i>mug142</i>	0.506	0,697	<i>dml1</i>	<i>SPCC1223.09</i>	0.52	0,567
<i>wee1</i>	<i>alp14</i>	0.509	0,801	<i>rad9</i>	<i>cdc2</i>	0.595	0,697	<i>rga8</i>	<i>pom1</i>	0.508	0,566
<i>hus1</i>	<i>cdc2</i>	0.631	0,801	<i>SPBC3E7.09</i>	<i>SPCC1795.10C</i>	0.507	0,696	<i>mph1</i>	<i>ctf18</i>	0.548	0,566
<i>pom1</i>	<i>mph1</i>	0.6	0,798	<i>mhf1</i>	<i>SPBPB2B2.01</i>	0.513	0,696	<i>rad9</i>	<i>mph1</i>	0.556	0,564
<i>mug142</i>	<i>ptc2</i>	0.551	0,795	<i>rps802</i>	<i>ptc2</i>	0.524	0,696	<i>SPAC3H1.05</i>	<i>rpl502</i>	0.516	0,562
<i>clp1</i>	<i>alp14</i>	0.69	0,790	<i>pom1</i>	<i>ptc2</i>	0.626	0,695	<i>clp1</i>	<i>fkh2</i>	0.553	0,561
<i>rad3</i>	<i>mug142</i>	0.555	0,790	<i>cdc25</i>	<i>ase1</i>	0.562	0,695	<i>clp1</i>	<i>hus1</i>	0.617	0,560
<i>cdc2</i>	<i>mug142</i>	0.567	0,790	<i>ppa2</i>	<i>SPBC947.01</i>	0.528	0,694	<i>ctf18</i>	<i>SPBC947.01</i>	0.575	0,559
<i>rad26</i>	<i>ctf18</i>	0.679	0,789	<i>ppa2</i>	<i>stc1</i>	0.521	0,694	<i>rad26</i>	<i>cdc2</i>	0.571	0,552
<i>SPAC31G5.18C</i>	<i>SPBC947.01</i>	0.559	0,785	<i>rps802</i>	<i>mug142</i>	0.502	0,692	<i>arp8</i>	<i>ptc2</i>	0.503	0,552
<i>SPAC23C11.10</i>	<i>SPBC947.01</i>	0.567	0,782	<i>cch1</i>	<i>SPCC1795.10C</i>	0.532	0,688	<i>fkh2</i>	<i>ctf18</i>	0.584	0,552
<i>SPAC23C11.10</i>	<i>SPBC25H2.15</i>	0.582	0,780	<i>mph1</i>	<i>alp14</i>	0.6	0,688	<i>mal3</i>	<i>hus1</i>	0.52	0,552
<i>pom1</i>	<i>mug142</i>	0.62	0,779	<i>yam8</i>	<i>SPAC3H1.05</i>	0.555	0,687	<i>yam8</i>	<i>rga7</i>	0.523	0,550
<i>rad17</i>	<i>ctf18</i>	0.696	0,777	<i>SPAC31G5.18C</i>	<i>ppa2</i>	0.545	0,681	<i>mpr1</i>	<i>stc1</i>	0.576	0,545
<i>SPAC3H1.05</i>	<i>SPBPB2B2.01</i>	0.519	0,775	<i>SPCC1223.09</i>	<i>ptc2</i>	0.516	0,681	<i>mug142</i>	<i>ctf18</i>	0.544	0,544
<i>SPAC25H1.07</i>	<i>SPBC25H2.15</i>	0.555	0,773	<i>mph1</i>	<i>rad3</i>	0.549	0,679	<i>rad17</i>	<i>SPBC3E7.09</i>	0.547	0,544
<i>mug132</i>	<i>SPBC947.01</i>	0.501	0,772	<i>yam8</i>	<i>mug142</i>	0.501	0,677	<i>pom1</i>	<i>rps802</i>	0.51	0,538
<i>mug132</i>	<i>SPBC25H2.15</i>	0.54	0,770	<i>clp1</i>	<i>SPBC3H7.03C</i>	0.57	0,671	<i>SPAC631.02</i>	<i>rad26</i>	0.583	0,537
<i>SPBC25H2.15</i>	<i>SPBC3E7.09</i>	0.602	0,767	<i>cdc2</i>	<i>ptc2</i>	0.505	0,670	<i>dbr1</i>	<i>SPAC23C11.10</i>	0.522	0,534
<i>SPAC23C11.10</i>	<i>mhf1</i>	0.55	0,766	<i>yam8</i>	<i>SPCC1795.10C</i>	0.576	0,669	<i>cdc25</i>	<i>alp14</i>	0.627	0,533
<i>mug132</i>	<i>mhf1</i>	0.509	0,766	<i>rga8</i>	<i>SPBC3E7.09</i>	0.587	0,669	<i>rad9</i>	<i>mug142</i>	0.556	0,533
<i>mug142</i>	<i>alp14</i>	0.525	0,766	<i>rad3</i>	<i>alp14</i>	0.52	0,668	<i>hus1</i>	<i>mug142</i>	0.567	0,530
<i>mug132</i>	<i>SPBC3E7.09</i>	0.529	0,764	<i>pom1</i>	<i>rga7</i>	0.653	0,668	<i>yam8</i>	<i>ptc2</i>	0.512	0,524
<i>SPAC23C11.10</i>	<i>SPBC3E7.09</i>	0.553	0,764	<i>cdc25</i>	<i>pom1</i>	0.595	0,668	<i>hus1</i>	<i>wee1</i>	0.542	0,523
<i>SPAC23C11.10</i>	<i>SPAC31G5.18C</i>	0.514	0,763	<i>SPAC25H1.07</i>	<i>SPCC1795.10C</i>	0.62	0,668	<i>dml1</i>	<i>mhf1</i>	0.525	0,520
<i>rps802</i>	<i>rpl502</i>	0.703	0,763	<i>cdc25</i>	<i>mph1</i>	0.566	0,667	<i>pom1</i>	<i>dml1</i>	0.582	0,518
<i>SPBC25H2.15</i>	<i>SPBC947.01</i>	0.542	0,763	<i>SPBC16E9.09C</i>	<i>SPCC1795.10C</i>	0.558	0,666	<i>mph1</i>	<i>cdc2</i>	0.516	0,518
<i>mhf1</i>	<i>mhf2</i>	0.593	0,761	<i>vps32</i>	<i>SPBPB2B2.01</i>	0.518	0,664	<i>rga8</i>	<i>arp42</i>	0.504	0,516
<i>mph1</i>	<i>wee1</i>	0.577	0,760	<i>SPBC947.01</i>	<i>wee1</i>	0.578	0,662	<i>arp42</i>	<i>SPBC25H2.15</i>	0.539	0,513
<i>pom1</i>	<i>mpr1</i>	0.507	0,760	<i>SPAC25H1.07</i>	<i>cch1</i>	0.503	0,661	<i>ptc2</i>	<i>wee1</i>	0.534	0,512
<i>SPAC23C11.10</i>	<i>dml1</i>	0.555	0,760	<i>cdc25</i>	<i>rga7</i>	0.546	0,659	<i>clp1</i>	<i>pom1</i>	0.623	0,509
<i>clp1</i>	<i>cdc25</i>	0.602	0,760	<i>rad17</i>	<i>mph1</i>	0.573	0,656	<i>dml1</i>	<i>arp8</i>	0.518	0,505
<i>rad17</i>	<i>SPAC631.02</i>	0.588	0,759	<i>dml1</i>	<i>SPBC3E7.09</i>	0.657	0,656				
<i>mug142</i>	<i>SPCC1223.09</i>	0.535	0,759	<i>rga8</i>	<i>SPBC947.01</i>	0.557	0,652				

Figura S1. Red de interacción, predicha con Plnt entre los genes comunes identificados para la red con *wee1-50* y *cdc2-3w*. (247 parejas de interacciones)



# Materiales y métodos

## 1. Microorganismos utilizados

### 1.1 Cepas de *Schizosaccharomyces pombe*

Para realizar este trabajo se utilizaron las cepas descritas en la [Tabla 1](#).

**Tabla 1. Cepas de *Schizosaccharomyces pombe***

Cepa	Genotipo	Procedencia
1	<i>h- igo1::kanMX6</i>	Este trabajo
12	<i>h+ cdc25-22 igo1::kanMX6</i>	Este trabajo
15	<i>h- cdc25-22</i>	Este trabajo
21	<i>H+ wee1-50 igo1::kanMX6</i>	Este trabajo
33	<i>h+ ppa2::natMX6</i>	Este trabajo
64	<i>h+ igo1::kanMX6 ppa2::natMX6</i>	Este trabajo
81	<i>h- igo1::ura4<sup>+</sup></i>	Este trabajo
84	<i>h- pab1::kanMX6</i>	Este trabajo
173	<i>h- ppk18::kanMX6</i>	Este trabajo
179	<i>h+ tor2-51:ura4<sup>+</sup></i>	Este trabajo
181	<i>h- tor2-51:ura4<sup>+</sup> ura4-D18 igo1::kanMX6</i>	Este trabajo
193	<i>h-igo1::natMX6</i>	Este trabajo
199	<i>h- igo1:igo1-S102A</i>	Este trabajo
205	<i>h- igo1::natMX6 ppk18::kanMX6</i>	Este trabajo
224	<i>h- pka1::ura4<sup>+</sup> ura4-D18</i>	Este trabajo
226	<i>h+ pka1::ura4<sup>+</sup> ura4-D18 igo1::kanMX6</i>	Este trabajo
234	<i>h+ igo1:igo1-S64E</i>	Este trabajo
236	<i>h+ igo1:igo1-S64A</i>	Este trabajo
242	<i>h+ wee1-50 ppa2::natMX6</i>	Este trabajo
245	<i>h+ cdc25-22 ppa2::natMX6</i>	Este trabajo
253	<i>h- igo1::NatMX6 pab1::kanMX6</i>	Este trabajo
259	<i>h- igo1::kanMX6 pom1::ura4<sup>+</sup> ura4-D18</i>	Este trabajo
260	<i>h- igo1::kanMX6 pyp2::ura4<sup>+</sup> ura4-D18</i>	Este trabajo
262	<i>h+ pyp2::ura4<sup>+</sup> ura4D-18</i>	Este trabajo
264	<i>h? igo1::kanMX6 sty1::ura4<sup>+</sup> ura4-D18</i>	Este trabajo
266	<i>h? sty1::ura4<sup>+</sup> ura4-D18</i>	Este trabajo

## Materiales y Métodos

269	<i>h? igo1::kanMX6 cdr1::natMX6</i>	Este trabajo
271	<i>h+ cek1::ura4<sup>+</sup> ura4D-18</i>	Este trabajo
274	<i>h+ cek1::ura4<sup>+</sup> ppk18::kanMX6 ura4-D18</i>	Este trabajo
275	<i>h- kanMX6:nmt1:3HA-ppk18</i>	Este trabajo
277	<i>h- kanMX6:nmt1:3HA-ppk18 igo1::NatMX6</i>	Este trabajo
283	<i>h- cdc2-3w::natMX6 igo1::kanMX6</i>	Este trabajo
290	<i>h+ aur-mcherry:atb2 hht2:GFP:ura4+ ura4d-18 igo1::kanMX6</i>	Este trabajo
294	<i>h- rad3::kanMX6</i>	Este trabajo
295	<i>h- rad3::kanMX6 igo1::natMX6</i>	Este trabajo
S817	<i>h- pom1::ura4+ ura4-D18</i>	Sergio Moreno
S999	<i>h+ wee1-50</i>	Sergio Moreno
S1000	<i>h- wee1-50</i>	Sergio Moreno
S2201	<i>h- 972</i>	Sergio Moreno
S2215	<i>h- cdc25-22</i>	Sergio Moreno
S2165	<i>h- cdc2-3w:natMX6</i>	Sergio Moreno
S2267	<i>h+ cdr1::natMX6</i>	Francisco Navarro
S2307	<i>h+ kanMX6:nmt1:3HA-ppk18</i>	Sergio Moreno
S2308	<i>h- ppa1::kanMX6</i>	Sergio Moreno
S2309	<i>h+ aur-mcherry:atb2 hht2:GFP:ura4<sup>+</sup> ura4d-18</i>	Sergio Moreno

### 1.2 Cepas de *Escherichia coli*

Se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  cuyo genotipo se describe en la Tabla 2. Se empleó para la producción del ADN recombinante de *igo1*<sup>+</sup> en el vector *pBluescript SK+* y su posterior mutagenización. Las células competentes se prepararon en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG) siguiendo el protocolo descrito por Inoue *et al.* 1990.

**Tabla 2. Cepas de *Escherichia coli***

Cepa	Genotipo	Procedencia
DH5 $\alpha$	<i>F- <math>\Phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK- , mK+) phoA supE44 <math>\lambda</math>- thi-1 gyrA96 relA1</i>	IBFG

## 2. Medios y condiciones de cultivo

### 2.1 Cultivos de *S. pombe*

## Materiales y Métodos

Para cultivar las células de *S. pombe* se emplearon los medios descritos en Moreno *et al.* 1991. Las células se crecieron en medio rico (YES) compuesto por extracto de levadura 0,5% y glucosa 3%, suplementado con 250 mg/l de histidina, leucina, uracilo, adenina y lisina; y en medio mínimo (MM) 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). Dependiendo del caso, se utilizaron para el MM diferentes fuentes de nitrógeno como sales o aminoácidos incluyendo cloruro de amonio 93,5 mM, ácido glutámico o glutamato 20 mM, isoleucina 20 mM y fenilalanina 20 mM. En casos específicos, se empleó MM sin nitrógeno. Cuando fue necesario, el MM se suplementó con 225 µg/ml de adenina, uracilo o leucina dependiendo de las auxotrofías de las cepas. En los experimentos de sobreexpresión, se añadió al MM, tiamina 5 µg/ml para mantener reprimido el promotor nmt1 (Maundrell, 1990)

Para el crecimiento en placa se utilizaron los mismos medios a los que se añadió agar al 2%. Como medio de esporulación se utilizó MEA (extracto de malta-agar). Como medio para comprobar la sensibilidad al calor o al frío y la diploidización se utilizó YES-Agar con floxina B 5mg/ml (YEP).

Todos las células de *S. pombe* se cultivaron en baños con una agitación constante de 110 rpm. Los preinóculos de cada ensayo se crecieron en medio rico YES y se agitaron en un incubador de aire a 200 rpm durante una noche. Cada vez que se inició un nuevo ensayo, las cepas fueron estriadas desde un *stock* en glicerol a -80°C en placas de YES-agar y replicadas a YEP agar para comprobar si eran haploides o diploides. En ningún caso se mantuvieron guardadas a 4°C, excepto para el escrutinio de sintéticos letales.

Los medios y las condiciones de cultivo utilizadas para el escrutinio de sintéticos letales, se describen en detalle en el apartado 3.2.3.

### 2.2 Cultivos de *E. Coli*

La estirpe de *E.coli* empleada se creció a 37°C en los medios y condiciones descritos en Sambrook *et al.* 1989.

## 3. Escrutinio Sistemático de Sintéticos Letales (SGA)

## **Materiales y Métodos**

### **3.1 Selección de mutaciones para el análisis genético**

Se seleccionaron los mutantes *wee1-50* y *cdc2-3w* con el fin de identificar a gran escala la red de interacción genética entre los genes no esenciales y la maquinaria de regulación primaria del ciclo celular de *S. pombe*.

#### **3.1.1 Marcaje de los mutantes *wee* (cepas de interés) y cepa silvestre (cepa control)**

Para la construcción de la cepa de interés *wee1-50:natMx6* se insertó el gen marcador *natMX6* a 715 pb corriente abajo del codón de parada de la fase de lectura abierta (ORF) del gen *wee1*<sup>+</sup> mutado, delecionando la zona intergénica adyacente de 136 pb. En el caso de la cepa de interés *cdc2-3w:natMX6*, se insertó el gen marcador a 448 pb corriente abajo del codón de parada de la ORF del gen *cdc2*<sup>+</sup> mutado, delecionando una zona intergénica de 144pb. La posición exacta del marcador se describe en la [Tabla 3](#). El marcador de resistencia fue amplificado por PCR a partir del plásmido *pFA6a-NatMX6* utilizando los oligonucleótidos *wee1-50:nat* F1 y *wee1-50:nat* R1 y *cdc2-3w:nat* F1 y *cdc2-3w:nat* R1 respectivamente ([Tabla 6](#)). El fragmento de ADN generado de 1,4 Kb, fue utilizado para transformar células de *S. pombe* auxotróficas para leucina en el fondo genético *wee1-50* y prototróficas en el fondo *cdc2-3w*. La selección de los clones positivos se realizó mediante PCR y se secuenciaron para confirmar la integración correcta del marcador. Para la construcción de la cepa control se insertó el gen marcador *natMX6* en el extremo 3' del gen *wee1*<sup>+</sup> silvestre, en la misma posición génica que para la cepa *wee1-50* ([Tabla 3](#)) y transformando células de *S. pombe* auxotróficas para leucina. Finalmente, se realizó un cruce de las cepas marcadas con una cepa silvestre para confirmar que el gen marcador segregaba ligado al gen de interés y en la proporción adecuada.

#### **3.1.2 Colección de los mutantes no esenciales de delección Bioneer (cepas diana)**

La colección de mutantes de delección fue desarrollada en conjunto por la compañía coreana Bioneer y el Instituto de Investigaciones en Ciencias Biológicas y Biotecnología de Corea del Sur (KRIBB) en colaboración con el Dr. Paul Nurse, del Centro de Investigación

investigación del Cáncer del Reino Unido. La versión 3.0 comprende 3346 cepas haploides que cubren aproximadamente el 93,5% de los genes no esenciales de *S. pombe*. Para su construcción, cada gen se eliminó y se reemplazó por un módulo de delección mediante recombinación homóloga. Cada módulo contiene el gen marcador *kanMX4*, que confiere resistencia a la geneticina (G418), y una pareja de códigos de barras que identifica cada delección como una entidad única (Kim *et al.*, 2010; <http://www.bioneer.com>).

### 3.2 Obtención de los dobles mutantes para el análisis genético

#### 3.2.1. Genotipos de las cepas parentales

Los genotipos de las cepas utilizadas en el escrutinio se detallan en la [Tabla 3](#).

**Tabla 3. Cepas parentales utilizadas en el escrutinio**

Tipo	Locus ( <i>natMX6</i> )	Genotipo
interés ( <i>query</i> )	725662...725798	<i>h- wee1<sup>+</sup>:natMX6 leu1-32</i> (S 2176)
interés ( <i>query</i> )	725662...725798	<i>h- wee1-50:natMX6 leu1-32</i> (S 2147)
interés ( <i>query</i> )	1502059...1502202	<i>h- cdc2-3w:natMX6</i> (S 2165)
Colección ( <i>target</i> )	-----	<i>h+ genX::kanMX6 ade6-M210 ura4-D18 leu1-32</i> <i>h+ genX::kanMX6 ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>

Las cepas de la colección poseen dos genotipos, que son producto de la segregación de un cepa diploide que contiene los dos tipos de alelos *ade6*, identificada por sus autores como **SP286** y cuyo genotipo es: *h+/h+ ade6-M210/ade6-M216 ura4-D18/ura4-D18 leu1-32/leu1-32* (Kim *et al.*, 2010; <http://www.bioneer.com>).

#### 3.2.2 Nomenclatura de las placas

La colección y sus mutantes de delección están distribuidos en 39 placas en formato de 96 pocillos. Las primeras 33 placas corresponden a la v2.0 de la colección (3004 mutantes) y las 6 restantes a la versión actualizada (341 mutantes nuevos y 206 reconstruidos), que en su conjunto corresponden a la v3.0. Cada cepa puede ser identificada por una coordenada que en su orden incluye: i) un número de placa; ii) una fila, designada por letras desde la A hasta la H y iii) una columna, numeradas del 1 al 12. Por ejemplo, en la versión 2.0 de la colección, el mutante *rad3Δ* se identifica por la coordenada 3G10, lo que significa que se ubica en la placa 3, fila G, columna 10.

## **Materiales y Métodos**

Para realizar el escrutinio y a su vez mantener la colección en su estado original se generaron tres copias de seguridad. Para la identificación de cada una, se marcó la cara frontal de cada placa con un rótulo que detalla la siguiente información: i) la versión de la colección (V2; V3 *upgrade*); ii) las siglas “SP” que abrevian el nombre *Schizosaccharomyces pombe*, iii) el número de la placa, iv) el medio de crecimiento de las células y el porcentaje de glicerol utilizado (YES+G418+Glic. 25%) y iv) la copia de seguridad (*Copy 1, Copy 2*). En la cara lateral se resume la versión, el número de la placa y el medio junto con la fecha de inoculación de las cepas.

### **3.2.3 Medios y condiciones de crecimiento**

Para generar las copias de seguridad las cepas diana se replicaron desde la colección original a placas de 96 pocillos (Nuncclon™ 96U) con 80 µl de YES líquido, utilizando un replicador de 96 puntas de acero (Nalgene Nunc Internacional). Seguidamente, se incubaron a 32°C durante tres días. Una vez crecidas, se completó el volumen de cada pocillo a 160 µl con medio selectivo YES con geneticina G418 (100 µg/ml; Duchefa) y glicerol 50%, y se almacenaron a -80°C. Una copia extra, con 160 µl de YES, se almacenó a 4°C durante la primera fase del escrutinio como material de partida. Todas las copias de seguridad fueron selladas con tapas de aluminio (*Thermowell sealing tapes*; Sigma-Aldrich).

Las cepas de interés se mantuvieron a -80°C y se aislaron en YES-Agar cada vez que fue necesario. Antes de ser cruzadas con la colección de mutantes, siempre se controló el genotipo comprobando su resistencia a nourseotricina en placas de YES-agar con ClonNat (75 µg/ml, Werner BioAgents); asimismo se controló la diploidización y su termosensibilidad verificando colonias rosas en YEP y el fenotipo *wee* con observaciones al microscopio desde colonia.

Para los cruces se utilizó 40 ml de MEA servido en placas *Omnitray* (86x128 mm; Thermo Scientific).

### **3.2.4 Concentración de drogas**

Para la comprobación de los mutantes sencillos (cepas de interés y diana) y la selección de los dobles mutantes (resultado final del escrutinio de sintéticos letales), se

emplearon placas *Omnitray* con 40 ml de YES-agar con G418 (Duchefa) a una concentración final de 100 µg/ml y ClonNat (Werner BioAgents) de 75 µg/ml; y placas de 96 pocillos con 100 µl de YES con G418 100 µg/ml.

### 3.2.5 Preparación de las cepas diana (*target*) y de interés (*query*)

Para facilitar el análisis de los resultados y el manejo del elevado número de placas, las 39 placas de la colección se dividieron en cuatro grupos y se realizó el escrutinio para cada grupo independientemente.

Para hacer un seguimiento del crecimiento de cada cepa de la colección, se realizaron lecturas de densidad óptica (D.O. <sub>570nm</sub>) en YES a las 72h y en YES con G418 (100 µg/ml) a las 48, 72 y 120 horas utilizando un espectrofotómetro lector de placas de 96 pocillos Modelo Ultra Evolution Tecan.

Para generar los dobles mutantes las cepas diana se replicaron, al menos por duplicado, en placas de 96 pocillos con 100 µl de YES y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Paralelamente, se crecieron las cepas de interés en 15 ml de YES a 25°C durante una noche y se mantuvieron en fase exponencial durante el día y la noche siguiente, calculando una D.O. (<sub>595nm</sub>) final de 0,8 en un volumen de 50 ml.

### 3.2.6 Cruce entre cepas diana (*target*) y de interés (*query*)

Con los cultivos anteriores, se ajustó la densidad óptica de las cepas de interés a las cepas diana y se dispensaron en placas de 96 pocillos. A partir del mismo formato de 96, se replicaron las cepas diana y de interés, una sobre otra, en placas *Omnitray* con MEA.

### 3.2.7 Esporulación

Las placas de MEA fueron incubadas a 25°C durante cuatro días para permitir la conjugación, meiosis y esporulación. La eficiencia de la conjugación se comprobó al tercer día, monitoreando la formación de ascas al microscopio.

### 3.2.8 Enriquecimiento de esporas y eliminación de parentales haploides y diploides

Tras cuatro días de incubación a 25°C, las placas se transfirieron a 42°C y se

## **Materiales y Métodos**

mantuvieron en dicha temperatura durante cuatro días más. Para evitar la deshidratación de los medios durante todo el proceso las placas se mantuvieron bajo humedad constante.

### **3.2.9 Germinación**

Para inducir la germinación de las esporas, las placas de MEA se replicaron a placas de YES-agar y se incubaron a 25°C durante dos días.

### **3.2.10 Selección de los dobles mutantes**

La selección de los dobles mutantes, se efectuó en dos pasos: i) **YES líquido con G418 y ClonNat a 25°C durante dos días**, para favorecer el enriquecimiento de la población de dobles mutantes y ii) **YES-agar con G418 y ClonNat**, para visualizar y valorar el crecimiento de las colonias sobre agar.

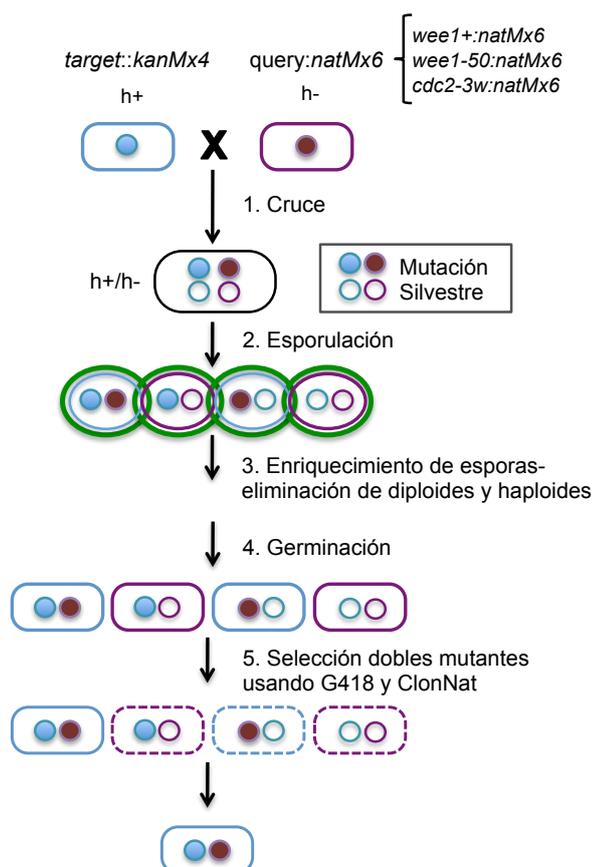
En el último paso de selección, cada colonia se replicó 4 veces, incrementando el formato de ordenamiento de las colonias de 96 a 384 puntos por placa. Las temperaturas de incubación fueron dependientes del cruce, es decir aquellas placas con dobles mutantes producto del cruce entre la colección y el parental *wee1-50*, se incubaron a 25°C y 35°C como temperatura permisiva y restrictiva respectivamente, y aquellos dobles mutantes producto del cruce entre la colección y el parental *cdc2-3w*, se incubaron sólo a 25°C. Los cruces control, entre la colección y la cepa silvestre marcada, se incubaron igualmente a 25°C y 35°C.

### **3.2.11 Visión en conjunto del protocolo del SGA**

La estrategia experimental empleada para llevar a cabo el escrutinio sistemático de sintéticos letales (SGA) se ilustra en la [Figura 1](#).

### **3.2.12 Digitalización de los resultados**

Para recopilar los resultados finales del escrutinio en formato digital, las placas finales con los dobles mutantes se escanearon tras 48 horas de incubación, utilizando un escáner modelo ScanMaker i900 MICROTEX. Las imágenes se adquirieron con una resolución de 300 ppp (puntos por pulgada ) y se almacenaron en formato TIFF.



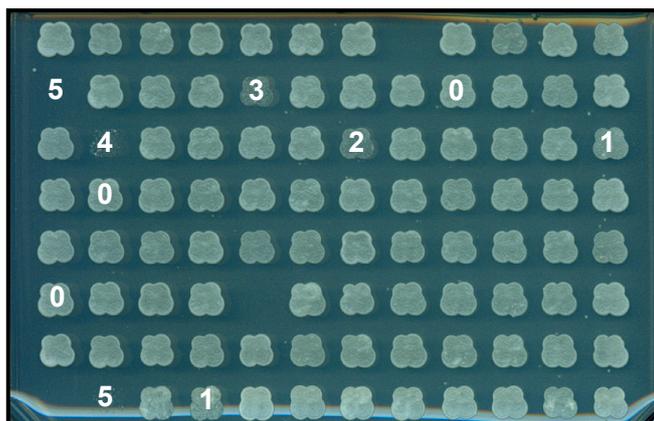
**Figura 1. Esquema que resume el protocolo experimental del escrutinio de sintéticos letales realizado en este estudio.** El término cepas *target* hace referencia a las cepas de la colección de deleción de *S. pombe* y el término *query* a las cepas de interés, para este caso los mutantes *wee1-50* y *cdc2-3w* y la cepa control. Adaptado de Dixon *et al.*, (2008).

### 3.2.13 Estimación del crecimiento de los dobles mutantes sobre agar

A pesar de que los resultados de las placas finales del escrutinio fueron digitalizados, la estimación del crecimiento de los dobles mutantes se hizo mediante inspección visual *in situ*. Para esto, se asignó a un total de 16.730 colonias un valor arbitrario de crecimiento, que fue definido en función de la densidad de la colonia. En su conjunto, dichos valores representaron una escala de cero a cinco, siendo cero el valor correspondiente a un crecimiento silvestre y cinco al correspondiente a un crecimiento nulo. Los valores intermedios reflejaron un crecimiento lento de la colonia.

En la [Figura 2](#) se visualiza la escala de crecimiento utilizada para estimar el crecimiento de los dobles mutantes sobre agar.

## Materiales y Métodos



**Figura 2.** Estimación del crecimiento de los dobles mutantes sobre agar mediante una escala arbitraria de valores que representa el crecimiento de las colonias en función de la densidad. El rango está comprendido entre valores positivos de cero a cinco, siendo cero el valor correspondiente a un crecimiento similar al silvestre y cinco el correspondiente a un crecimiento nulo. La imagen representa los datos finales del escrutinio de sintéticos letales almacenados en formato digital.

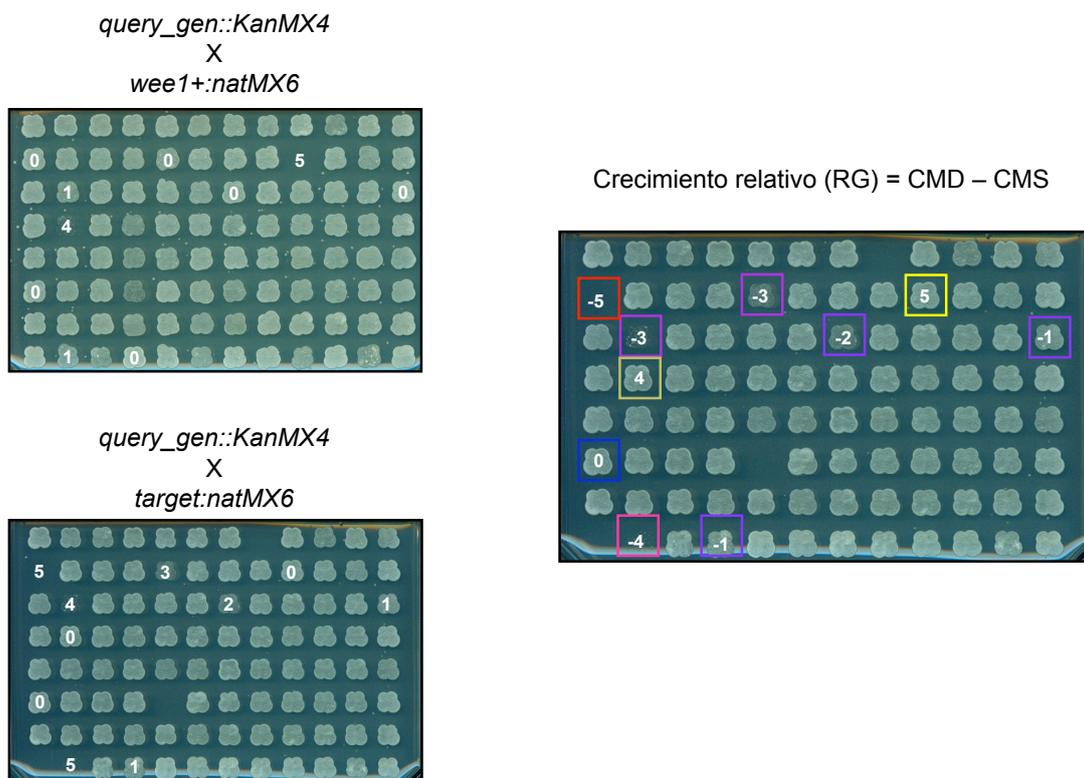
### 3.3 Procesamiento de datos

#### 3.3.1 Algoritmo de crecimiento relativo y rango de puntuación

Después de asignar un valor de crecimiento a cada colonia, se calculó el crecimiento relativo de los dobles mutantes, mediante una comparación cuantitativa entre el crecimiento del doble mutante (CMD) y el crecimiento del mutante sencillo o diana (CMS). La determinación del crecimiento del mutante diana fue el resultado del cruce entre los mutantes de la colección y la cepa silvestre, mientras que el crecimiento del mutante doble fue el resultado del cruce entre los mutantes de la colección y las cepas de interés.

El cálculo del crecimiento relativo se llevó a cabo mediante el uso del algoritmo RG (del inglés *Relative growth*), donde el crecimiento del mutante diana (CMD) fue restado al crecimiento del doble mutante (CMS), tomando en consideración la misma temperatura de incubación para ambos mutantes. En la Figura 3 se muestra un ejemplo de su uso.

A partir del uso del algoritmo RG, se generó un rango de puntuación de valores menores y mayores de cero, hasta cinco en ambos casos (Figura 4). Los valores negativos señalan aquellas interacciones que mostraron un fenotipo exacerbado con respecto al esperado, es decir aquellas capaces de agravar el fenotipo o causar la



**Figura 3.** Ejemplo del uso del algoritmo de crecimiento relativo (RG), dónde el crecimiento del doble mutante (CMD) es sustraído al crecimiento del mutante sencillo (CMS).

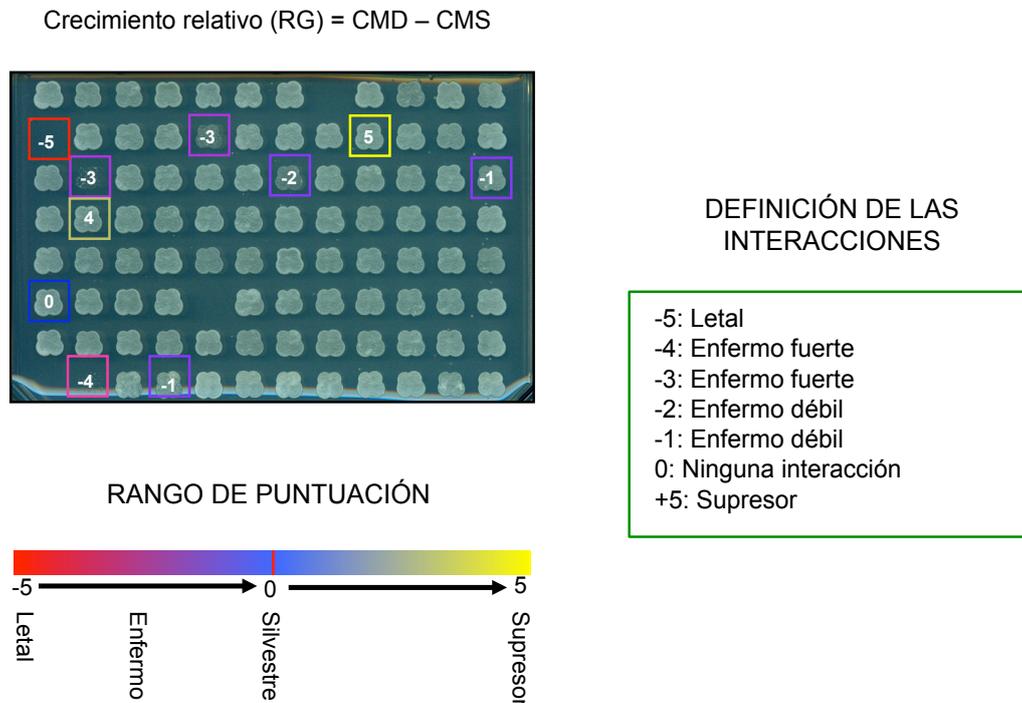
muerte de los mutantes parentales, y los valores positivos indican aquellas interacciones capaces de atenuar el fenotipo esperado, es decir suprimir el defecto de crecimiento de los mismos o no empeorarlo. Dichas interacciones negativas fueron definidas bajo los términos sintética letal (del inglés *synthetic lethal*) y sintética enferma (del inglés *synthetic sick*) y supresora (del inglés *suppressive*) Adicionalmente, en este estudio incluimos las variantes fuerte y débil al término sintético enfermo.

### 3.3.2 Pre-procesamiento y normalización

Los datos finales de crecimiento relativo se anotaron en tablas de Excel comparando el resultado inspeccionado *in situ* con las imágenes adquiridas. Para la normalización y corrección de los falsos resultados en el escrutinio, se tuvieron en cuenta diferentes parámetros que incluyen: **i)** los datos de crecimiento en líquido en YES y YES con G418 de las cepas de la colección, **ii)** el fenotipo de crecimiento de las cepas de la colección en agar (Algoritmo RG), **iii)** diferencias de crecimiento en el tiempo, **iv)** el efecto de la

## Materiales y Métodos

ausencia de una colonia sobre la colonia vecina y **v)** el efecto de genes ligados, estableciendo 200 Kb como distancia crítica, de acuerdo a lo descrito por Collins *et al.*, 2006.



**Figura 4.** Rango de puntuación generado a partir de la aplicación del algoritmo RG. Los valores están comprendidos entre valores positivos y negativos desde cero con un máximo de cinco en ambos casos. Los valores negativos relacionan aquellas interacciones genéticas definidas como letal, enfermo fuerte o enfermo

### 3.3.3 Control de calidad y grado de confianza

Para validar los resultados preliminares obtenidos en el escrutinio, cada uno de los mutantes identificados se inocularon y se ordenaron de nuevo en placas de 96 pocillos. Con dichas placas se repitió el escrutinio siguiendo el mismo procedimiento resumido en el apartado 3.2.11. Este escrutinio se realizó por triplicado y finalmente, sólo se consideraron como positivos a aquellas interacciones con un resultado reproducible al menos en dos réplicas del escrutinio. La mayoría de los positivos fueron comprobados mediante un análisis de esporas al azar y cuya metodología se describe en el apartado 8.3.2.

Teniendo en cuenta los resultados por triplicado, se calculó el crecimiento relativo promedio (del inglés *Averaged Relative Growth*; **ARG**) de las interacciones. Para corregir la variabilidad entre los valores obtenidos por cada validación en el SGA y el sesgo en el **ARG**, se calculó el coeficiente de varianza (CV). Para los genes pertenecientes a la categoría SL3 y SUP3 con un  $CV \geq 0,5$ , se eliminó el valor de interacción que se alejaba de la tendencia de los dos restantes y se recalculó la media aritmética sólo con dichos valores. Por último, en el caso de los genes pertenecientes a la categoría SL2 y SUP2 con un  $CV \geq 0,5$ , se definió el ARG seleccionando únicamente el valor más cercano a cero observado entre las dos validaciones que mostraron una reproducibilidad con el fin de evitar la sobreestimación del grado de interacción. En los casos con un  $CV < 0,5$ , se mantuvo el ARG como producto del cálculo de la media aritmética entre los valores observados. En consecuencia, el RG fue normalizado a ARG en función de la susceptibilidad de la interacción a la variación entre los crecimientos relativos estimados dependientes de la ejecución de cada validación.

## 4. Análisis fenotípico de los mutantes que interactúan con *wee1-50* y *cdc2-3w*

### 4.1 Estado morfológico y citológico

Con algunos mutantes identificados en el escrutinio, se realizó un análisis del estado morfológico y citológico mediante tinciones de la pared celular y el septo con calcoflúor, y del núcleo con DAPI respectivamente. Para esto, se fijaron células mutantes crecidas a 30°C hasta fase exponencial en medio YES y MM suplementado con adenina, leucina y uracilo.

### 4.2 Estado de la dinámica del ciclo celular

Para analizar el ciclo celular en los mutantes identificados en el escrutinio, se empleó una adaptación de la metodología desarrollada por Knutsen *et al.*, 2011, con la cual es posible separar células en fase G2 con un contenido 2C de ADN, de aquellas en fase G1 o mitosis tardía que también tienen el mismo contenido de ADN. Las condiciones y muestras experimentales fueron las mismas que las descritas en el apartado anterior.

## 5. Ensayos bajo estrés nutricional

## **Materiales y Métodos**

### **5.1. Estrés por nitrógeno. Análisis del ciclo celular**

Las células se crecieron en 15 ml de medio rico YES durante una noche a 25°C y se mantuvieron en fase exponencial durante el día. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con MM mediante filtración al vacío y se cambiaron a medio restrictivo (EMM) durante una noche para favorecer la adaptación de las células a los medios pobres. A la mañana siguiente, las células se lavaron de nuevo dos veces por filtración, pero esta vez con MM sin nitrógeno para eliminar los restos de nitrógeno anteriores. Se resuspendieron  $2 \times 10^6$  cel/ml en matraces independientes con 40 ml de EMM, MM con glutamato 20 mM, MM con leucina 20 mM, MM con fenilalanina 20 mM y MM sin nitrógeno. Los cultivos se mantuvieron en fase exponencial hasta 24 horas a 25°C y se tomaron muestras a diferentes tiempos 0, 2, 4, 6, 8 y 24 horas. Las muestras se fijaron con etanol 70% y se almacenaron a 4°C. Posteriormente se procesaron para su análisis por citometría y microscopía.

### **5.2 Estrés por nitrógeno. Medición del tamaño celular y ensayos bioquímicos**

Los ensayos de medición celular bajo estrés por nitrógeno se realizaron en las siguientes condiciones experimentales: i) tres medios de cultivo incluyendo medio rico YES y MM con glutamato 20mM como una fuente rica en nitrógeno y MM con fenilalanina 20mM como una fuente pobre en nitrógeno; y ii) tres temperaturas 25°C, 32°C y 36°C.

Para esto, se cultivaron células en 20 ml de medio rico YES durante una noche a 25°C como preinóculo. Dicho preinóculo se dividió en 4 cultivos independientes con 20 ml del mismo medio. Dos cultivos se incubaron a 25°C, otro a 32°C y el restante a 36°C. Cuando alcanzaron una D.O. <sub>(595nm)</sub> igual a 0,5-0,6, se tiñó una muestra de cada cultivo *in vivo* con calcoflúor para determinar el tamaño celular, y se fijaron células para análisis por citometría de flujo. En paralelo, se dejó crecer uno de los cultivos incubados a 25°C hasta una D.O. <sub>(595nm)</sub> igual 0,8-0,9 y se transfirieron las células a 20 ml de MM glutamato 20 mM, después de dos lavados con el mismo medio mediante filtración. Tras una noche, este preinóculo se dividió nuevamente en cuatro cultivos en MM glutamato 20 mM, de los cuales dos se incubaron a 25°C, uno a 32°C y otro a 36°C hasta fase exponencial y seguidamente se tomaron muestras para una tinción con calcoflúor y un análisis por FACS. Finalmente, las células de uno de los cultivos incubados a 25°C se transfirieron a fenilalanina mediante filtración y se analizaron del mismo modo en fase exponencial.

### 5.3 Estrés por glucosa.

Los ensayos de medición celular bajo estrés por glucosa se realizaron a 32°C en las siguientes condiciones experimentales: medio rico YES con glucosa 3%, YES con glucosa 0,15% y MM con cloruro amónico y glucosa 0,1%. La concentración de glucosa utilizada fue equivalente a 1/20 de la estándar establecida para cada medio.

Como preinóculo las células se crecieron en 20 ml de YES glucosa 3% durante una noche. Se mantuvieron en fase exponencial durante el día y se transfirieron a tres nuevas condiciones: **i)** YES glucosa 3%; **ii)** YES glucosa 2%; **iii)** MM glucosa 2%. Los dos últimas condiciones para adaptar las células a la condiciones finales de YES glucosa 0,1% y MM glucosa 0,1% respectivamente. Tras una noche de incubación, se lavaron las células por centrifugación dos veces con el medio siguiente y se inocularon nuevos cultivos de YES glucosa 3%, YES glucosa 0,15% y MM glucosa 0,1% a una D.O. ( $_{595nm}$ ) inicial de 0,2. Finalmente, se mantuvieron durante 6 horas en fase exponencial y se tomaron muestras para mediciones celulares y citometría de flujo. En todos los casos, a pesar de utilizar concentraciones bajas de glucosa, los tiempos de generación fueron cercanos a los establecidos para el medio rico YES y MM estándar. Para evitar estrés osmótico se añadió a los medios bajos en glucosa glicerol 3% según lo descrito en Bone *et al.*, 1998 y Madrid *et al.*, 2004.

## 6. Ensayos de viabilidad en placa

### 6.1 Ensayos de gota en *S. pombe*

Con el fin de observar una modulación en la temperatura restrictiva de las cepas ts en combinación con otra mutación, los ensayos se realizaron a cuatro temperaturas: 25°C, 30°C, 32°C y 36°C en placas de YEP-agar.

Para comprobar la termosensibilidad y garantizar el estado haploide de las cepas, se replicó una estría crecida previamente en YES-Agar a YEP-agar. Se seleccionó el clon adecuado de cada cepa y se inóculo un cultivo de 10 ml que se mantuvo a 25°C durante una noche. Se ajustó la densidad del cultivo a una D.O. inicial de 0,1 (equivalente a  $1 \times 10^6$  cel/ml) y se hicieron diluciones seriadas 1/10 hasta  $1 \times 10^2$  cel/ml en agua destilada estéril. De cada dilución se sembraron 5µl con una micropipeta multicanal (Finnpipette, Thermo

## **Materiales y Métodos**

scientific). Cada placa se incubó a las diferentes temperaturas.

Después de 16 horas de incubación, se adquirieron imágenes en monocapa de cada una de las cepas y condiciones evaluadas con una cámara digital Olympus C-5050 acoplada a un microscopio Olympus BX60, usando un objetivo 40x/0,40 AN. El crecimiento de las colonias se analizó hasta un periodo máximo de 72 horas.

## **7. Técnicas de transformación**

### **7.1 Transformación de *S. pombe***

Para transformar células de *S. pombe* se siguió una modificación del método del acetato de litio (LiAc) descrito por Bähler *et al.*, 1998. En cada transformación se emplearon  $2 \times 10^8$  células de un cultivo en crecimiento exponencial y entre 10-20  $\mu\text{g}$  de DNA. Para empezar se lavaron las células mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en una solución con acetato de litio (LiAc) 100 mM, Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM y Sorbitol 1 M. Posteriormente, las células se incubaron en dicha solución durante 30 minutos a temperatura ambiente y tras una centrifugación se concentraron en un volumen de 100  $\mu\text{l}$ . A este volumen se añadió 5  $\mu\text{l}$  de ADN de esperma de salmón previamente hervido y 10  $\mu\text{l}$  del ADN transformante. A continuación, se incubó la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente e inmediatamente se añadió 260  $\mu\text{l}$  de una solución de PEG 3,35 40%, LiAc 1M y TE. Esta mezcla se mantuvo en incubación durante 45-60 minutos a temperatura ambiente y tras este periodo se añadió 43  $\mu\text{l}$  de DMSO a la mezcla y se aplicó un pulso de calor de 5 minutos a 42°C. Después del pulso de calor, se centrifugaron las células a 2500 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 500  $\mu\text{l}$  de agua estéril. Finalmente, dicho volumen se dividió en tres partes iguales que fueron sembradas en YES-Agar e incubadas durante una noche a 25-32°C. Después de una noche de recuperación de la células, se replicaron a placas de YES-Agar con los respectivos antibióticos según el marcador de selección integrado en el genoma (G418 y ClonNat). Las placas se incubaron a 25-32°C durante 3-6 días.

### **7.2 Transformación de *E. Coli***

Se siguió el protocolo descrito por Kushner (1978). Para esto, se descongelaron 70  $\mu\text{l}$  de células competentes en hielo, se les añadió 5  $\mu\text{l}$  del ADN transformante y se incubaron

durante 20 minutos. Seguidamente, se aplicó un pulso de calor de 90 segundos a 42°C. Inmediatamente, se transfirieron a hielo y se mantuvieron en estas condiciones durante 1-2 minutos. Posteriormente, se añadió 400 µl de medio de cultivo LB y se incubó la mezcla en agitación durante 1 hora a 37°C. Finalmente, se resuspendieron las células en 100 µl y se sembraron en placas de LB con el antibiótico frente al cual confiere resistencia el plásmido introducido, para este estudio ampicilina.

## 8. Construcción de cepas de *S. pombe*

### 8.1 Delección de genes

Para deletar *igo1*<sup>+</sup>, *ppa2*<sup>+</sup>, *pab1*<sup>+</sup> y *ppk18*<sup>+</sup> y para construir los mutantes sobreexpresores de *igo1*<sup>+</sup>, *ppk18*<sup>+</sup> y *cdc25*<sup>+</sup> se siguieron los procedimientos descritos por Bähler *et al*, 1998

#### 8.1.1 Delecciones en un fondo genético haploide

##### 8.1.1.1 Delección de *igo1*<sup>+</sup>

El *cassette* de resistencia a la kanamicina *kanMX6* fue amplificado por PCR a partir del plásmido pFA6A-*kanMX6* (Bähler *et al.*, 1998) utilizando los oligonucleótidos *igo1*-D1 e *igo1*-D2 (Tabla 5). Cada uno de estos, contiene 100 nucleótidos, donde los primeros 80 del extremo 5' y el extremo 3' corresponden a la secuencia corriente arriba (*upstream*) del codón de inicio y corriente abajo (*downstream*) del codón de parada de la ORF *igo1*<sup>+</sup>, respectivamente. Los restantes 20 nucleótidos corresponden a las secuencias flanqueantes del *kanMX6* del plásmido. Dicho producto de PCR de 1,6 Kb fue utilizado para transformar *S. pombe* mediante recombinación homóloga. Para seleccionar aquellos clones con un reemplazamiento correcto, se llevaron a cabo reacciones de PCR de colonia con los oligonucleótidos *igo1*-C1 e *igo1*-C2, que anillan sobre los 200-300 nucleótidos inmediatamente anteriores al codón de inicio o posteriores al codón de parada de *igo1*<sup>+</sup>. Asimismo, para construir algunos mutantes en un fondo de delección de *igo1*<sup>+</sup>, se intercambió el marcador *kanMX6* por el *natMX6* utilizando los oligonucleótidos *swi*-F1 y *swi*-R1.

##### 8.1.1.2 Delección de *ppa2*<sup>+</sup>

## Materiales y Métodos

### 8.1.1.2 Delección de *ppa2*<sup>+</sup>

En este caso, el gen *ppa2*<sup>+</sup> se reemplazó por el *cassette* de resistencia a la nourseotricina *natMX6*. Para esto, se utilizaron los oligonucleótidos *ppa2*-D1 y *ppa2*-D2 (Tabla 6) para amplificar dicho *cassette* a partir del plásmido pFA6A-*natMX6* (Hentges *et al.*, 2005). Para favorecer la amplificación se agregó DMSO 5% a la reacción de PCR. El producto de PCR de 1,2 Kb se empleó para transformar *S. pombe* y los clones recombinantes se comprobaron utilizando los oligonucleótidos *ppa2*-C1 y *ppa2*-C2 mediante PCR de colonia. Tomando ventaja de la existencia de un único sitio de restricción Nru1 en el gen marcador *natMX6* y de su ausencia en la ORF del gen *ppa2*<sup>+</sup>, se digirió el producto de PCR de 1,4 Kb amplificado con los oligonucleótidos mencionados anteriormente, y se seleccionó como clones positivos aquellos dónde la digestión enzimática generó dos fragmentos de 900 pb y 600 pb.

### 8.1.1.3 Delección de *pab1*<sup>+</sup>

Al igual que la delección de *igo1*<sup>+</sup>, la ORF de *pab1*<sup>+</sup> se reemplazó por el marcador de resistencia a la kanamicina *kanMX6*. Para amplificar el *cassette*, a partir del plásmido pFA6A-*kanMX6* (Bähler *et al.*, 1998), se utilizaron los oligonucleótidos *pab1*-D1 y *pab1*-D2 y se confirmó la integración en el genoma mediante PCR con los oligonucleótidos *pab1*-C1 y *pab1*-C2. Los dobles mutantes que incluyen la delección de *pab1*<sup>+</sup> fueron obtenidos siguiendo esta misma metodología.

## 8.1.2 Delección en un fondo genético diploide

### 8.1.2.1 Construcción del diploide h+/h-

Se cruzaron los parentales con el genotipo descrito en la Tabla 4 en MEA a 32°C durante 18-20 horas. Seguidamente, se estrió el cruce en MM-Agar sin aminoácidos y se incubó a 32°C durante 2-3 días o hasta ver colonias muy pequeñas, las cuales fueron aisladas inmediatamente en YES-Agar a 32°C. Una vez crecidas, se replicaron a YEP-Agar y MEA, se incubaron a 25°C y finalmente se seleccionaron aquellas colonias con color rojo intenso y que formaron ascas acigóticas. El genotipo del diploide construido fue *h-/h+ ade6-M216/ade6-M210 ura4-D18/ura4-D18 leu1-32/leu1-32*.

Tabla 4. Cepas parentales para la construcción del diploide

Cepa	Genotipo	Procedencia
S1348	<i>h- ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	Sergio Moreno
S1349	<i>h+ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	Sergio Moreno

### 8.1.2.2 Delección de *ppk18*<sup>+</sup>

Utilizando los oligonucleótidos *ppk18*-D1 y *ppk18*-D2 (Tabla 6) se amplificó el *cassette kanMX6* a partir del plásmido pFA6A-*kanMX6* (Bähler *et al.*, 1998). Con el producto de PCR de 1,6 Kb se transformó la cepa diploide descrita en el apartado anterior. Se comprobaron los clones diploides con un reemplazamiento correcto mediante PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos *ppk18*-C1 y *ppk18*-C2. Tras esta comprobación, se indujo la esporulación en aquellos clones positivos y se seleccionaron los clones haploides resistentes a geneticina entre los productos meióticos obtenidos. Finalmente, se comprobaron dichos haploides por PCR de colonia utilizando los mismos oligonucleótidos.

### 8.2 Integración de la construcción *KanMX6-p3nmt1-3HA* en el locus *ppk18*<sup>+</sup>

En este caso, la amplificación de la construcción *KanMX6-p3nmt1-3HA* con las zonas de homología para su integración en el extremo 5' del gen *ppk18*<sup>+</sup>, se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos OE Ppk18-F1 y OE 3HA-Ppk18-R1. Para dirigir la recombinación homóloga en el extremo 5' de la ORF del gen, el F1 se diseñó en sentido 5' a 3', con los 80 nucleótidos aguas arriba al codón de inicio de *ppk18*<sup>+</sup> y 20 nucleótidos que anillan cerca del extremo 3' del gen *kanMX6* del plásmido. En el caso del F2, se diseñó desde el extremo 5', con los primeros 80 nucleótidos aguas abajo del codón de inicio de *igo1*<sup>+</sup> y 20 nucleótidos que anillan cerca del extremo 3' del gen *nmt1*. Con el producto de 2,9 Kb se transformó *S. pombe*. De igual modo, se seleccionaron los clones recombinantes empleando las parejas de oligonucleótidos *ppk18*-C1/ *Kan*-C2 y C1-*nmt1*/ OE 3HA-Ppk18 I2, las cuales generaron dos fragmentos de 301 pb y 334 pb respectivamente, y se secuenciaron para confirmar la integración correcta de la construcción.

### 8.3 Cruces genéticos

## **Materiales y Métodos**

Para construir dobles mutantes, los mutantes sencillos se cruzaron en medio de esporulación MEA y se incubaron a 25°C durante 2-4 días. Tras este periodo, se comprobó al microscopio la formación de ascas cigóticas, como producto de una conjugación apropiada. Todos los dobles mutantes empleados en este estudio, excepto aquellos generados en el escrutinio de sintéticos letales y aquellos dobles con el mutante de delección *pab1Δ*, fueron obtenidos mediante disección de tétradas. En el caso del escrutinio, los dobles mutantes fueron obtenidos por análisis de esporas al azar y los dobles mutantes con el mutante *pab1Δ* mediante transformación.

### **8.3.1 Disección de tétradas**

Para la disección de las tétradas, los mutantes sencillos se cruzaron en MEA durante 2 días. Una vez comprobada la eficiencia del cruce, las 4 esporas de cada asca se separaron ordenadamente con un micromanipulador (Singer Instruments) sobre placas de YES-Agar. Una vez germinadas, se analizó el genotipo de cada una y la segregación apropiada.

### **8.3.2 Análisis de esporas al azar**

Para comprobar las interacciones genéticas negativas identificadas en el escrutinio de sintéticos letales, se repitieron los cruces de forma manual, sin utilizar el replicador de puntas de acero. Para esto, inicialmente se sembraron tanto las cepas de interés como las cepas diana en placas de YES. Tras 2 días de crecimiento a 25°C, se resuspendieron por separado, cada cepa diana y de interés con un palillo estéril en placas de 96 pocillos con 40ul de agua estéril. Seguidamente se ajustaron las densidades para ambas cepas y se mezclaron en un mismo pocillo en relación 1:1 (diana: interés). Posteriormente, empleando una micropipeta multicanal, se sembraron 2,5 µl del volumen total del cruce en placas de MEA a 25°C durante 4 días. Finalmente, las placas se sellaron y se guardaron a 4°C.

Para el análisis de esporas al azar, se resuspendió un poco de la biomasa de las colonias en placas de 96 pocillos con 150 µl de agua estéril y 5% de β-glucoronidasa (Sigma-Aldrich) y se incubaron las placas a 25°C durante una noche. Al siguiente día, las colonias fueron sometidas a un pulso de calor de 55°C durante 45-60 minutos para eliminar remanentes de células vegetativas. A continuación, las colonias se lavaron dos veces con agua estéril, se resuspendieron en 100 µl de agua estéril y se sembraron

en relación 1:2:2:4 en placas de YES, YES-Nat, YES-G418 o YES-G418-Nat. Tres días después, se registró el número de colonias viables y se comparó el número y tamaño de las colonias que crecieron sobre el medio con un antibiótico con respecto al medio con dos antibióticos. Finalmente, los resultados se digitalizaron y se describieron las interacciones cualitativamente como: i) interacción sintética y ii) interacción sintética enferma fuerte (del inglés *synthethic lethal*, *synthethic sick*).

## 9. Técnicas de manipulación del ADN

### 9.1 Métodos de extracción

#### 9.1.1 Extracción de ADN genómico de *S. pombe*

Para extraer el ADN genómico se recogieron 10 ml de cultivo en fase estacionaria. Tras centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos, las células se resuspendieron en 1 ml de una solución de citrato/fosfato 50 mM, EDTA 40 mM, sorbitol 1,2 M a la que se le había añadido 2,5 mg de Zimoliasa 20T (Seikagaku Corporation), la cual rompe la pared celular de la levadura. Las células fueron incubadas a 37°C en esta solución durante 30 minutos. Transcurrido este periodo, se comprobó al microscopio que al añadir SDS 1% las células perdían su refringencia.

A continuación, las células se centrifugaron durante 10 segundos y se resuspendieron en 550 µl de TE con SDS 1%. Las células se incubaron en esta solución durante 15 minutos a 65°C. Para precipitar las proteínas, se añadió 175 µl de acetato potásico 5M y se incubó la solución en hielo durante 5 minutos. Seguidamente, se centrifugó durante 15 minutos a 4°C y se pasaron 500 µl del sobrenadante a otro tubo.

Para precipitar los ácidos nucleicos, se añadió 500 µl de isopropanol al sobrenadante y se mantuvo a -20°C durante, al menos 10 minutos. A continuación, se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se lavó el precipitado con 500 µl de etanol 70% frío.

Para eliminar el ARN, se resuspendió el precipitado en 350 µl de TE con 50 µg/ml de RNasa (Roche) y se incubó a 65°C durante 10 minutos.

## **Materiales y Métodos**

A continuación, se hicieron dos extracciones con fenol utilizando 500 µl de fenol: cloroformo 1:1. El ADN se precipitó con 40 µl de acetato sódico 3M y 750ul de etanol frío y se mantuvo a -20°C durante, al menos 10 minutos. Por último, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos, se lavó el precipitado de ADN con 1 ml de etanol al 70% y se dejó secar. El ADN se resuspendió en 50 µl de TE.

### **9.1.2 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli***

Para extraer el ADN plasmídico de *E. coli*, en el caso que el ADN se fuera a emplear para secuenciar, transformar o clonar, se utilizaron columnas Quiaprep Spin Miniprep (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuando no fue necesario que el ADN fuera de alta calidad, se siguió el protocolo de lisis hervido (Holmes y Quigley, 1981; Sambrook *et al.*, 1989). Para ello, se inocularon 2 ml de medio LB con ampicilina (50 µg/ml) y se incubaron durante una noche a 37°C. A continuación, se centrifugaron 1,5 ml de cultivo y las células se resuspendieron en 200 µl de tampón de lisis STET (sacarosa 8%, Triton X-100 0,5%, EDTA 50 mM y Tris-HCl 10 mM pH 8). Se añadieron 140 µg de lisozima (Roche) para degradar la pared de las bacterias. Posteriormente, las células se hirvieron durante 1 minuto y se centrifugaron inmediatamente durante 10 minutos a 13.200 rpm. Los restos celulares se retiraron con un palillo. Para precipitar el ADN, se añadieron 200 µl de isopropanol y se centrifugó a 4°C durante 15 minutos. Para lavar el ADN precipitado, se emplearon 500 µl de etanol 70% frío y se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 rpm. El precipitado, una vez seco, se resuspendió en 50 µl de TE con 10 µg de RNasa (RNasa 10 mg/ml, Roche).

### **9.2 Digestión de ADN con enzimas de restricción**

La digestión de moléculas de ADN se llevó a cabo utilizando endonucleasas de restricción de Thermo Scientific y New England Biolabs. Las soluciones tampones utilizadas y la temperatura a las que se realizaron las digestiones fueron, en cada caso, las recomendadas por el fabricante.

### **9.3 Electroforesis de fragmentos de ADN**

La separación por tamaños de las moléculas de ADN se llevó a cabo mediante la

electroforesis en geles de agarosa. En función del tamaño de las moléculas a separar, se prepararon geles entre el 0,5% y el 3% de agarosa (Seakem® LE). Para preparar el gel y electroforesis se utilizó TAE (Tris-acetato 40mM pH 8.0, EDTA 1mM) y se añadió 0,5 ug/ml de bromuro de etidio, para su visualización bajo la irradiación con luz UV. Los tamaños de las moléculas se estimaron comparando con el marcador de tamaño molecular 1kB plus DNA ladder (Invitrogen). Se emplearon cubetas de Apelex y fuentes para electroforesis de BioRad. Las separaciones electroforéticas se hicieron a voltaje constante (90V).

### 9.4 Purificación de fragmentos de ADN

Para la extracción de ADN de los geles de agarosa y para la purificación de los productos de PCR se utilizaron los *kits* JETquick Gel Extraction Spin (Genomed) y JETquick PCR Purification (Genomed), respectivamente. El ADN purificado se eluyó en TE.

### 9.5 Plásmidos

En la [Tabla 5](#) se detallan los plásmidos utilizados en este trabajo y se especifica su procedencia y el fin de su uso.

**Tabla 5. Plásmidos**

Nombre	Descripción	Aplicaciones	Procedencia
p901	pBluescriptKS- <i>ura4</i> <sup>+</sup>	Delección de <i>igo1</i> <sup>+</sup>	Col. S. Moreno
p799	pFA6a-kanMX6	Delección de <i>igo1</i> <sup>+</sup> , <i>pab1</i> <sup>+</sup> y <i>ppk18</i> <sup>+</sup>	Col. S. Moreno
p1134	pFA6a-natMX6	Delección de <i>ppa2</i> <sup>+</sup>	Col. S. Moreno
p910	<i>pFA6a-kanMX6-nmt1-3HA</i>	Sobreexpresión fuerte de <i>3HA-ppk18</i>	Col. S. Moreno
p1064	pBluescriptSK+	Clonaje de la ORF de <i>igo1</i> <sup>+</sup>	Col. S. Moreno
p1210	pBluescriptSK+ <i>-igo1</i> <sup>+</sup>	Integración y mutagénesis del gen <i>igo1</i> <sup>+</sup>	Este trabajo

### 9.6 Determinación de la concentración de ADN

La concentración de ADN, tanto de doble como de cadena sencilla, se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), considerando una relación de absorbancia 260/280 de 1,8 como estimación del grado de pureza del ADN.

## Materiales y Métodos

### 9.7 Reacciones de amplificación de ADN (PCR)

Para amplificar fragmentos de ADN mediante PCR se utilizaron ADN polimerasas Taq de Roche, Stratagene y Boline, junto con las soluciones tampón recomendadas en cada caso por el fabricante. En algunos casos se utilizaron ADN polimerasas con actividad de corrección de errores, como la *High Fidelity* de Roche y la *PfuTurbo* de Stratagene. En otros casos, como PCR de colonia, se empleó la ADN polimerasa Biotaq™ de Boline y como ADN molde, biomasa de levadura previamente calentada en el microondas a máxima potencia durante 1,5 minutos antes de llevar a cabo la reacción de amplificación. En todos los casos, la mezcla de reacción contuvo: **i)** ADN molde (100-200 ng de ADN genómico ó 15-20 ng de ADN plasmídico; **ii)** 100 pmoles de cada oligonucleótido; **iii)** 25 pmoles de cada dNTP (Roche) y **iv)** 2,5 U de la polimerasa correspondiente en 100 µl de solución tamponada. Las reacciones de amplificación de ADN se realizaron en un termociclador T3000 de Biometra. Las condiciones fueron dependientes del tamaño de la secuencia, las recomendaciones del fabricante de la enzima y los oligonucleótidos utilizados.

#### 9.7.1 Lista de oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de amplificación de ADN, fueron sintetizados por Thermo Scientific y Sigma-Aldrich. La [Tabla 6](#) especifica los oligonucleótidos utilizados en este trabajo, junto con sus respectivas aplicaciones.

### 9.8 Secuenciación de ADN

La secuenciación se llevó a cabo en el servicio de Genómica del IBMCC, utilizando un secuenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystem).

#### 9.9 Mutagénesis dirigida: construcción del mutante *igo1-S64A* e *igo1-S64E*

##### 9.9.1 Construcción de la cepa *igo1::ura4+*

Para la construcción de la cepa *igo1::ura4+* se siguió el protocolo descrito por Bähler *et al.*, 1998. Inicialmente, se amplificó el gen marcador *ura4<sup>+</sup>* desde el plásmido *pBluescriptKS-ura4<sup>+</sup>* utilizando los oligonucleótidos *igo1-D1 ura4<sup>+</sup>* y *igo1-D2 ura4<sup>+</sup>*.

Tabla 6. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	Aplicación
wee1-50:nat F1	GATCTTGCTGAATGGCAAATAATTGGTTATGTT TATGGAAAATGCCACGATTTACTAACGAAGTTT AATAACCCGTTAGACGGATCCCCGGGTTAATT AA	Construcción de la cepa <i>wee1<sup>+</sup>:natMx6</i> y <i>wee1-50:natMx6</i>
wee1-50:nat R1	TTCTAACTTTTCTGTTTCAAATAAATGTTTATT TAGATATGAAGTGTTAAACGGGTCATTAATAATC CTATACTAATTTGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Construcción de la cepa <i>wee1<sup>+</sup>:natMx6</i> y <i>wee1-50:natMx6</i>
wee1-50:nat C1	GTAGACTCGGCTTCAGAGGA	Construcción de la cepa <i>wee1<sup>+</sup>:natMx6</i> y <i>wee1-50:natMx6</i>
wee1-50:nat C2	GCTTCAGAATTTCTCTCATT	Construcción de la cepa <i>wee1<sup>+</sup>:natMx6</i> y <i>wee1-50:natMx6</i>
cdc2-3w:nat F1	CCTCATTTATACTATATTCTATTTACATATTTTT TATACTTAAGTATTAATAAAGGTGTATATTCTTT AGACTTTAGTTTTCGGATCCCCGGGTTAATTAA	Construcción de la cepa <i>cdc2-3w:natMx6</i>
cdc2-3w:nat R1	TAGACTTAAGCTGTAAATGATGCTCGCTTAGC GTTCAATATAGTGTGAAATACAAATATTCATAT CACTTTCATCTTGTAGAATTCGAGCTCGTTTAA AC	Construcción de la cepa <i>cdc2-3w:natMx6</i>
cdc2-3w:nat C1	GCCATTAAATGTGAATTTAG	Construcción de la cepa <i>cdc2-3w:natMx6</i>
cdc2-3w:nat C2	GTGCATGCGCAGTTTAATGG	Construcción de la cepa <i>cdc2-3w:natMx6</i>
igo1-D1	ATCGACAAAATTACGTATGATACCTAATACGTT AACAGTGCGGTATCTTAGGCTTCGGTAGACAA GTGGCCGTGTGGTATCGTACGCTGCAGGTCTG AC	Delección de <i>igo1<sup>+</sup></i>
igo1-D2	ACGACAAGCAATACCAAATTTAAGAGCCAAG CCAAATTAACCTCCAACCTTGTCGCAAAAATA GCAACGTGTATGACCATCGATGAATTCGAGCT CG	Delección de <i>igo1<sup>+</sup></i>

## Materiales y Métodos

igo1-C1	AGATTAGCTCATTGAGCCGC	Comprobación de la delección de <i>igo1</i> <sup>+</sup> y sobreexpresión de Igo1
igo1-C2	CAGAAGTGTGTCCTCCATC	Comprobación de la delección de <i>igo1</i> <sup>+</sup>
ppa2-D1	CGGTCTCAACTTACCAAAAGCAACACACGGTTAGA AAGACTTATAACTTGCTTTTTACTATATACAAAATTC CATAATTACGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección de <i>ppa2</i> <sup>+</sup>
pab1-D2	TTAACTCAAAAATCAGAAAGGTGGATAAATTTTTTG AAACAATCACAATCGATTGATCACTCATTAGAGAAT TGAAACTTATCGATGAATTCGAGCTCG	Delección de <i>ppa2</i> <sup>+</sup>
ppa2-C1	AGAGTAGCCTGTCACCTCTG	Comprobación de la delección de <i>ppa2</i> <sup>+</sup>
ppa2-C2	TTCGTATGCGGAGGATGTAC	Comprobación de la delección de <i>ppa2</i> <sup>+</sup>
pab1-D1	AAGATCAAGATCTTCGTATACAATTGAAATTGGCAA AGTGACCAACGGGAACGAAATCTTAATATAATACG AGTAGAAGCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección de <i>pab1</i> <sup>+</sup>
pab1-D2	TCCCGGAAGTTCAATAAAAAAGGAACTATGTTTCAGT CTATCCGTAGATCATAAAAAACAACTCCACA TAAGGACAATCGATGAATTCGAGCTCG	Delección de <i>pab1</i> <sup>+</sup>
pab1-C1	CGAAGAGTGGTGTAGATTCCG	Comprobación de la delección de <i>pab1</i> <sup>+</sup>
pab1-C2	GATTCACGGCATAATGAAG	Delección de <i>pab1</i> <sup>+</sup>
ppk18-D1	AATAACGAAACGCTAATTGTATTGGAATGGTTTTAC TTGTGCGACATTAGGATCAAAATCTGAATGGAGTTA TAAAGTTACGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección de <i>ppk18</i> <sup>+</sup>
ppk18-D2	TCGAGAAACAAAAAGGAAAAAATTAAGAGAGTATG GTAACAACAAAAATGAGCAATCACGATTAACAAAC GTTTGAACATCGATGAATTCGAGCTCG	Delección de <i>ppk18</i> <sup>+</sup>

## Materiales y Métodos

ppk18-C1	TGACACAGTCATCAAGAGCC	Comprobación de la delección de <i>ppk18</i> <sup>+</sup>
ppk18-C2	CGTTCAGGAGAAGATGAGCT	Comprobación de la delección de <i>ppk18</i> <sup>+</sup>
igo1-D1 ura4 <sup>+</sup>	ATCGACAAAATTACGTATGATACCTAATACGTTAAC AGTGCGGTATCTTAGGCTTCGGTAGACAAGTGGCC GTGTGGTATCGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	Delección de <i>igo1</i> <sup>+</sup>
igo1-D2 ura4 <sup>+</sup>	ACGACAAGCAATACCAAATTTTAAGAGCCAAGCCAA ATTAACCTCCAACCTTGTGCGAAAAATAGCAACGT GTATGACCAGCGGATAACAATTTACACAGGA	Delección de <i>igo1</i> <sup>+</sup>
igo1-D2 ura4 <sup>+</sup>	ACGACAAGCAATACCAAATTTTAAGAGCCAAGCCAA ATTAACCTCCAACCTTGTGCGAAAAATAGCAACGT GTATGACCAGCGGATAACAATTTACACAGGA	Delección de <i>igo1</i> <sup>+</sup>
5' igo1-BamHI	TTTTGGATCCGAGTATGCAAAGTCTTCGTC	Clonaje de <i>igo1</i> <sup>+</sup> en pBluescript SK+
3' igo1- EcoRI	TTTTGAATTCACGAAGAAAAGGAATGCGCG	Clonaje de <i>igo1</i> <sup>+</sup> en pBluescript SK+
igo1_S31A_F	TTAACTGAAATAGAAATTAGCGCCAGAAGAACAGA AGCTTTTCCG	Mutagénesis <i>igo1</i> :S31A
igo1_S31A_R	CGGAAAAGCTTCTGTTCTTCTGGCGCTAATTTCTAT TTCAGTTAA	Mutagénesis <i>igo1</i> :S31A
igo1_S64A_F	AGGTAGAAAATACTTTGATGCCGGCGACTATGCCT TAAACA	Mutagénesis <i>igo1</i> :S64A
igo1_S64A_R	TGTTTAAGGCATAGTCGCCGGCATCAAAGTATTTTC TACCT	Mutagénesis <i>igo1</i> :S64A
igo1_S64E_F	CAAGGTAGAAAATACTTTGATGAAGGCGACTATGC CTTAAACAAA	Mutagénesis <i>igo1</i> :S64E
igo1_S64E_R	TTTGTTTAAGGCATAGTCGCCCTTCATCAAAGTATTTT CTACCTTG	Mutagénesis <i>igo1</i> :S64E

## Materiales y Métodos

igo1_S102A_F	CCGTGTTGTCAGTGCTGGGGCTCCTAATAAAGAGC CGTCTC	Mutagénesis igo1:S102A
igo1_S102A_R	GAGACGGCTCTTTATTAGGAGCCCCAGCACTGACA ACACGG	Mutagénesis igo1:S102A
igo1_BamHI_out	TGGACGCAGCGATAAAATGC	Comprobación del clonaje de <i>igo1</i> <sup>+</sup> en pBluescript SK+
igo1_EcoRI_out	TGGACGCAGCGATAAAATGCACGACAATAGTGCAA TACGC	Comprobación del clonaje de <i>igo1</i> <sup>+</sup> en pBluescript SK+
pka1-C1	CGCTCTTTCTATCTACGCTG	Comprobación de la delección de <i>pka1</i> <sup>+</sup>
pka1-C2	GTGCTACAAACGTCACCTGC	Comprobación de la delección de <i>pka1</i> <sup>+</sup>
pka1-I1	TTCCATGTCGCTGCTGTTCC	Comprobación de la delección de <i>pka1</i> <sup>+</sup>
OE3HA-Ppk18 F1	AATAACGAAACGCTAATTGTATTGGAATGGTTTTAC TTGTCGCACATTAGGATCAAAATCTGAATGGAGTTA TAAAGTTAGAATTGAGCTCGTTTAAAC	Sobreexpresión de la proteína 3HA-Ppk18
OE3HA-Ppk18 R1	AAATCTAACTCCAAGACATAAATGTTGTCTATTCCG TGATTTACTTTGTTATCCTCGTTGGAATTGCGTTCTT GCATTACGCACTGAGCAGCGTAATCTG	Sobreexpresión de la proteína 3HA-Ppk18
OE 3HA-Ppk18 I2	GTAACATCGCCCGCTATTCC	Comprobación de la sobreexpresión de la proteína 3HA-Ppk18
C1-nmt1	GTCATTCGGCAATGTGCAGCG	Comprobación de las sobreexpresiones
ura4 <sup>+</sup> C1	GTAGCGATATCATCATTGTTGG	Comprobación de delecciones
ura4 <sup>+</sup> C2	TGATAACACAGACATAGGGTCCA	Comprobación de delecciones

swi_F1	GACATGGAGGCCCAAGAATAC	Intercambio de gen marcador
swi_R1	TGGATGGCGGCGTTAGTATC	Intercambio de gen marcador
Kan-C1	AGCTGCGCACGTCAAGACTG	Comprobación deleciones
Kan-C	CAGATGCGAAGTTAAGTGCG	Comprobación deleciones

Con el fragmento de 2,2 Kb se transformó células de *S. pombe* auxotróficas para uracilo. Los clones recombinantes se analizaron por PCR utilizando los oligonucleótidos igo1-C1 e igo1-C2. Adicionalmente, se analizó el comportamiento fenotípico de la construcción *igo1::ura4<sup>+</sup>* comparado con el de la construcción *igo1::kanMX6*.

### **9.9.2 Clonaje de *igo1<sup>+</sup>* en *pBluescriptSK-ura4<sup>+</sup>***

Como primer paso, se amplificó un fragmento de 1132 pb a partir de ADN genómico. Dicho fragmento comprendió los 302 pb de la región aguas arriba adyacente al codón de inicio de *igo1<sup>+</sup>*, los 529 pb correspondientes a la ORF de *igo1<sup>+</sup>* y los 301 pb de la región aguas abajo adyacente al codón de parada del mismo. La reacción de PCR, se realizó empleando oligonucleótidos que incluyeron los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI en el extremo 5' y 3' respectivamente. A continuación, se purificó por columna el producto de PCR y se verificó su tamaño en un gel de agarosa de 0,8%. Para clonar el fragmento de ADN en el plásmido *pBluescriptSK<sup>+</sup>* se digirieron el vector y el inserto con las enzimas de restricción apropiadas a 37°C durante una noche. Se separaron las moléculas resultantes en geles de agarosa y se purificó el ADN necesario para la ligación. Para evitar la religación del vector, antes de purificarlo se trató con fosfatasa alcalina (CIAP, 20U/μl, Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la ligación, se empleó la enzima ligasa (ADN ligasa T4, 1U/μl, Thermo Scientific). Las reacciones se incubaron a 16°C durante la noche. Se empleó la mitad de la reacción para transformar las células competentes de *E. coli*. Se extrajo el ADN plasmídico de los transformantes obtenidos y se comprobó mediante cortes con enzimas si contenían el inserto. Asimismo, se secuenciaron aquellos clones positivos empleando 400ng en cada reacción (Tabla 5).

### **9.9.3 Mutagénesis**

Para la mutagénesis puntual del gen *igo1<sup>+</sup>* se empleó el *Kit QuikChange II XL Site-*

## **Materiales y Métodos**

*Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada reacción de mutagénesis, se empleó, como ADN molde, 10ng del vector *pBluescriptSK+-igo1<sup>+</sup>* y 125 ng de los oligonucleótidos *igo1-XXX-F1* y *igo1-XXX-R1* que contenían la mutación deseada (Tabla 5), en un volumen de 50  $\mu$ l. Posteriormente, los productos de PCR mutados, se trataron con la endonucleasa de restricción *DpnI* (Agilent Technologies) para degradar el ADN plasmídico metilado parental y a continuación se transformaron células competentes de *E. coli* con 1/10 de la reacción de mutagénesis. Como paso final, se extrajo el ADN plasmídico de los transformantes y se comprobó si la mutagénesis fue correcta mediante digestiones con enzimas de restricción y secuenciación.

### **9.9.4 Integración en el genoma de *S. pombe***

Con el ADN plasmídico mutado, se transformaron células de *S. pombe* en las cuales el gen *igo1<sup>+</sup>* fue reemplazado previamente por el gen marcador *ura4<sup>+</sup>*. Para llevar a cabo la transformación, se digirieron 3-5  $\mu$ g del plásmido mutado con las enzimas *BamHI* y *EcoRI*, con el fin de separar el vector del inserto, y se precipitó dicha digestión para concentrar el ADN transformante. Para favorecer el crecimiento de los clones recombinantes, primero se recuperaron las células transformadas en MM con uracilo a 25°C durante una noche y tras este periodo, se realizó una doble contraselección en medio mínimo con ácido 5-Fluoroorótico 0,1% (5-FOA; Apollo Scientific) a 25°C. Finalmente, se comprobaron los clones positivos con la mutación deseada mediante la secuenciación de un fragmento de 1339 pb, amplificado por PCR, que incluía la ORF del gen *igo1<sup>+</sup>*.

## **10. Técnicas de manipulación de proteínas**

### **10.1 Obtención de los anticuerpos policlonales anti-igo1**

#### **10.1.1 Obtención del anticuerpo anti-Igo1-C-terminal**

El péptido C-GASSRRESVTRHDLE, correspondiente a la región carboxilo terminal de la proteína de Igo1, fue sintetizado por la empresa BioNova Científica S.L. Para obtener el anticuerpo, se inmunizó una coneja de raza neozelandesa. Antes de la inyección, para favorecer la respuesta inmune, el péptido se acopló a la proteína KHL (*Keyhole Limpet Hemocyanin*; Calbiochem) siguiendo el protocolo descrito por Sambrook *et al.* 1989. Para preparar la inyección, se utilizó 1mg/ml del péptido acoplado con el

adyuvante de Freund completo (Freund's Complete Adjuvant; Pierce) en relación 1:1 para incrementar la inmunogenicidad. Para las inmunizaciones restantes, se redujo a la mitad el antígeno y se mezcló con el adyuvante de Freund incompleto (Freund's Incomplete Adjuvant; Pierce). En total, se realizaron seis inyecciones de antígeno separadas por un intervalo de tres semanas y a partir, de la tercera inyección, se recogieron muestras de sangre pasados diez días del último pinchazo. Tras la sexta inmunización, se sangró en su totalidad al animal por el corazón. La obtención del suero a partir de la sangre y la purificación se realizó siguiendo la metodología descrita en Harlow y Lane, (1988), dónde previamente se acopló el mismo péptido, que se usó como antígeno, a una columna de afinidad CrBN-activated Sefarosa 4B (Amersham Pharmacia Biotech). A la columna acoplada con el péptido, se añadió 12ml de suero. Tras una noche de incubación a 4°C, la columna se lavó varias veces con 200 µl de una solución de Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y 0,5 M NaCl, se comprobó una absorbancia <0,01 a 280 nm y se eluyó con glicina-HCl 100 mM pH 2,6 para obtener el anticuerpo. Este se obtuvo repartido en varias fracciones (100 µl de 1M Tris-HCl pH 8 y 900 µl del eluido). En todos los experimentos de *Western Blot* se utilizó el anticuerpo purificado de la cuarta sangría.

### 10.1.2 Obtención del anticuerpo fosfo-específico anti-S64-Igo1

Se sintetizó el péptido C-GRKYFD**S**pGDYALNK fosforilado en la Ser 64 y correspondiente a la región central de la proteína Igo1. Asimismo, se sintetizó el péptido no fosforilado en el mismo residuo. La obtención del anticuerpo fosfo-específico se realizó de manera similar a la descrita en el apartado anterior. Con el fin de obtener el anticuerpo fosfoespecífico de la proteína Igo1, se purificó el suero de la cuarta sangría en dos etapas. En primer lugar, se acopló el péptido no fosforilado, para eliminar los anticuerpos contra el péptido no fosforilado. En la segunda fase, el *flow-through* de la etapa anterior, se cargó nuevamente en la columna de afinidad, pero en este caso con el péptido **fosforilado** acoplado. Se lavo y se eluyó de igual forma. Este procedimiento se repitió una vez más. Finalmente, se obtuvo el anticuerpo con alta afinidad por el péptido fosforilado de la proteína Igo1.

## 10.2 Inmunodetección por *Western Blot*

### 10.2.1 Preparación de extractos proteicos en condiciones desnaturalizantes

## **Materiales y Métodos**

Se empleó ácido tricloroacético (TCA) siguiendo una metodología modificada a la previamente descrito por Foiani *et al.* 1994. Para preparar los extractos de proteínas, se recogieron  $2 \times 10^8$  células de *S. pombe* y se lavaron con 1 ml de TCA 20% frío. Tras este paso, se resuspendieron en un volumen final de 50  $\mu$ l de TCA 20% y se congelaron a -20°C.

Para la extracción de proteínas se añadió 500  $\mu$ l de bolas de vidrio (4mm; Sartorius) a las células, previamente descongeladas en hielo. A continuación, se rompieron en una Fast-prep (Bio-101) mediante tres ciclos de 15 segundos a potencia 5,5. A la suspensión de células rotas, se añadió 400  $\mu$ l de TCA 5% y se homogenizó con el vortex. La mezcla se transfirió a un tubo limpio haciendo un agujero en la base del tubo y centrifugando 10 segundos a 7000 rpm. Seguidamente, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el precipitado. Se añadió una solución de SDS-Tris base (60  $\mu$ l de SDS 10% y 40  $\mu$ l Tris-base 1 M en 200  $\mu$ l de agua destilada). Se hirvió la mezcla durante 5 minutos y para recuperar la proteínas, se centrifugó 2 minutos a 13200 rpm. Finalmente, se recuperó el sobrenadante y se congeló a -20°C.

### **10.2.2. Valoración de la concentración de proteína en los extractos totales**

Antes de congelar se separó 1  $\mu$ l del extracto para valorar la concentración de las proteínas. En este caso, se empleó el *kit Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo Scientific). Se elaboró una recta patrón utilizando concentraciones conocidas de proteína BSA y se determinó mediante una reacción colorimétrica la concentración de las reacciones problema. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 562 nm utilizando un espectrofotómetro modelo Hitachi U-2001.

### **10.2.3 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE**

La separación de moléculas de proteínas se llevo a cabo en geles de poliacrilamida. Según el peso molecular, se prepararon geles entre el 10% y el 15% de poliacrilamida, con una mezcla de Protogel 30% acrilamida: bisacrilamida (37,5:1 ratio; National Diagnostics) y SDS. En un caso particular, se emplearon geles de gradiente entre 8-16% (Miniprotean TGX Precast gels; BioRad). Antes de la carga del gel, los extractos proteicos se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron durante 2 minutos a máxima velocidad. Por cada extracto, se cargaron en total 45  $\mu$ g de proteína en un volumen final

15 µl de SB 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%).

Para la electroforesis se emplearon cubetas Mini-Protean II (BioRad) y una solución de Tris HCl 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1% pH 8.3 como tampón de carrera. El apilamiento de las proteínas se llevó a cabo a un voltaje constante de 100V y la separación de las proteínas a un amperaje constante de 20 mA. Para estimar el peso molecular, se usó el marcador pre-teñido *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific). La electroforesis se llevó a cabo sobre una cama de hielo.

### 10.2.4 Análisis por *Western blot* en membranas de PVDF

Una vez separadas las proteínas fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF), empleando como tampón de transferencia, una solución de CAPS 10 mM pH 11 y metanol 10%. El tiempo de transferencia fue de 1 hora y 40 minutos a un amperaje constante de 320 mA. Toda la transferencia se llevó a cabo sobre una cama de hielo. Una vez finalizada, se tiñeron las membranas con el colorante Ponceau (BioRad) durante 10 minutos para evaluar la calidad de la transferencia. A continuación, se bloquearon las membranas con leche 5% (Sveltesse, Nestlé), Tris Base-NaCl (TBS) y Tween 0,05% durante, al menos 1 hora a temperatura ambiente. Para la detección de las proteínas, se empleó un anticuerpo específico contra la proteína en cuestión. Dependiendo del anticuerpo, la solución de incubación y el tiempo variaron. En algunos casos, se incubaron las membranas con leche 5% en TBS-Tween 0,05% y en otros, con BSA 5% (Sigma-Aldrich) en TBS-Tween 0,05%. Asimismo, el tiempo mínimo de incubación fue de dos horas a temperatura ambiente o el máximo durante una noche a 4°C. Tras este periodo y lavar el anticuerpo primario con TBS-Tween 0,05% tres veces, se expusieron las membranas al anticuerpo secundario correspondiente, ligado a la peroxidasa de rábano para amplificar la señal. En todos los casos, la incubación fue de 45 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se retiró el exceso de anticuerpo lavando cuatro veces con TBS-Tween 0,05%. Para la detección colorimétrica, se emplearon los *kits* de detección Armersham (*ECL™ Western Blotting Detection reagents, GE Healthcare*), Advansta (*Western Bright™ Quantum Western Blotting detection*) y Thermo Scientific (*Supersignal® West Dura Extended*) y películas de revelado Agfa.

Para el control de carga, se incubaron las membranas con el anticuerpo anti-TAT1 o anti-Cdc2. Cuando se requirió incubar con un nuevo anticuerpo, se eliminó en su totalidad

## Materiales y Métodos

los anteriores con cloruro de guanidinio 7M y lavados sucesivos con TBS-Tween 0,05%.

### 10.3 Anticuerpos utilizados

En la [Tabla 6](#) se relacionan los anticuerpos utilizados en este estudio, incluyendo el propósito y sus condiciones de uso.

**Tabla 6. Anticuerpos**

Anticuerpo	Organismo	Tipo	Condiciones	Procedencia
anti-Igo1 (C-terminal)	conejo	policlonal	WB 1:200	Este trabajo
anti-fosfo-S64-Igo1	conejo	policlonal	WB 1:100	Este trabajo
anti-HA (12CA5)	ratón	monoclonal	WB 1:5000	Roche
Anti-fosfo-S51-Eif2- $\alpha$	conejo	policlonal	Wb 1:1000	Cell signaling
anti-AKT <i>substrate</i> (fosfo-S/T-RpS6)	conejo	policlonal	WB 1:1000	Cell signaling
Anti-Cdc2	conejo	policlonal	Wb 1:50	Sergio Moreno
anti-TAT1 (tubulina)	ratón	monoclonal	WB 1:3000	K. Gull
anti-IgG-ratón	oveja	policlonal	WB 1:2500	Amersham
anti-IgG-conejo	burro	policlonal	WB 1:3000	Amersham

## 11. Microscopía y tinciones

### 11.1 Microscopía de campo claro

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

### 11.2 Microscopía de contraste interferencial (DIC) y fluorescencia

Para capturar imágenes de tinciones con calcoflúor y DAPI se utilizaron los microscopios de fluorescencia verticales Nikon Eclipse 90i y Zeiss Axioplan 2, ambos equipados con una cámara CDD Hamamatsu modelo ORCA-ER y objetivos de inmersión Plan Apo-Chromat VC 60x y 63x respectivamente. Las imágenes fueron capturadas con el programa MetaMorph® (Molecular devices) y Openlab (Improvision) respectivamente

Para los ensayos de *time-lapse* se utilizó el microscopio confocal Olympus *Spinning Disk* con módulo FRAP láser equipado con una cámara IX2-UCB, empleando el objetivo de inmersión 60x/1,42 A/N. Las imágenes se adquirieron y se procesaron con el programa MetaMorph® versión 7-7.10.0 (Molecular devices).

### 11.2.1 Tinción de núcleos y septos con DAPI

Para la tinción de núcleos con DAPI se recogió un volumen de cultivo correspondiente a  $10^7$  células. Tras centrifugar y lavar una vez con agua destilada, las células se fijaron con 1 ml de etanol frío al 70% y se guardaron a 4°C hasta su procesamiento. De cada muestra, se tomaron 100  $\mu$ l de células fijadas, las cuales se rehidrataron lavándolas con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM pH 7,2). Seguidamente, se resuspendieron en 2  $\mu$ l de una solución de DAPI 0,1  $\mu$ g/ml de PBS (4,6-diamidino-2-fenilindol; Sigma-Aldrich). Se extendió la muestra sobre un portaobjetos previamente tratado con poli-L-lisina según las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich). Se colocó un cubreobjetos y se observó la tinción nuclear al microscopio de fluorescencia.

### 11.2.2 Mediciones celulares *in vivo* mediante tinción con *blankophor*

Para la tinción con calcoflúor se tomaron 200  $\mu$ l de un cultivo en fase exponencial ( $\text{D.O}_{595 \text{ nm}}$  entre 0,5 y 0,8). Se lavaron las células con PBS, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 3  $\mu$ l de *blankophor* 50  $\mu$ g/ml (Bayer) y 2  $\mu$ l de PBS. La muestra, se extendió sobre un portaobjetos y se observó la tinción al microscopio de fluorescencia.

Una vez adquiridas las imágenes, se determinó el tamaño celular midiendo la longitud de las células septadas, ya que las células de *S. pombe* en la mitosis y la citoquinesis presentan una longitud celular constante. Los valores de la media y la desviación estándar se determinaron midiendo 100 células. La comparación entre cepas se hizo mediante el test de comparación T de Student para dos muestras independientes y para una muestra.

### 11.2.3 Ensayos de *time-lapse* con fluorescencia

Para seguir el comportamiento *in vivo* de una mitosis mediante fluorescencia, se realizó un ensayo de *time-lapse* en MM con fenilalanina 20mM a 32°C, usando un portaobjeto

## **Materiales y Métodos**

durante 24 horas. Seguidamente, se transfirieron a MM con glutamato 20mM, retirando el medio anterior por centrifugación, y se incubaron durante una noche. Al día siguiente, se retiró el medio del mismo modo y se inocularon las células a una D.O.<sub>(595nm)</sub> inicial de 0,5 en MM con fenilalanina 20 mM. Inmediatamente, se pre-incubaron durante 20 minutos en agitación a 32°C. Durante este periodo, se trató un pocillo con lectina 10mg/ml (L1395-5MG) según las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich) y se dejó secar al aire durante 20 minutos. Tras la pre-incubación, se dispensaron 300µl del cultivo y se dejaron en contacto con la lectina durante 3 minutos. Finalmente, se retiró todo el volumen y se lavó dos veces con 200 µl del mismo medio. A continuación, se tomaron imágenes de las células cada dos minutos durante 2 horas. Cada imagen fue el producto de la proyección máxima de 7 planos transversales de la célula, tomados cada 0,5 µm.

## **12. Citometría de flujo**

### **12.1 Fijación y tinción de las células**

Esta técnica se utilizó para analizar el contenido de ADN de las células en las diferentes etapas del ciclo celular, siguiendo el protocolo descrito por Sazer y Sherwood, 1990 y un método adaptado al descrito por Knutsen *et al.*, 2011.

Para obtener las muestras, se recogieron y se fijaron células según el procedimiento para la tinción de núcleos con DAPI del apartado anterior. Se rehidrataron 300 µl de células fijadas mediante dos lavados con el mismo volumen de citrato sódico 50 mM. A continuación, se incubaron con RNasa 100 µg/ml en 500 µl de citrato sódico 50 mM a 37°C durante una noche. Al siguiente día, se tiñeron los núcleos con 500 µl de una solución de ioduro de propidio 4 µg/ul y citrato sódico 50 mM.

### **12.2 Adquisición y análisis de resultados**

Antes de examinar las muestras, se sonicaron durante 10 segundos a una amplitud de 20% con un sonicador Misonix XL2010. Finalmente, se analizaron en un citómetro FACSCalibur utilizando el programa de adquisición y análisis de datos BD Cell Quest Pro™ 6.0.3 (Biosciences). Para este estudio, se tuvieron en cuenta los parámetros de detección del contenido de ADN FL2-A, FL2-H y FL2-W.

## 13. Tratamiento informático y estadístico de los datos

### 13.1 Análisis informático del escrutinio

Inicialmente, para la organización de los datos y las definiciones de las interacciones genéticas, se empleó Excel 2011 para Mac (Microsoft Corporation) y el programa Serial List 2.3 (<http://serialbasics.free.fr/Softwares.html>). Para la integración, el análisis y la visualización de los datos en los diagramas de interacción, se utilizó la plataforma informática Cytoscape y su complemento **BINGO** (del inglés *The Biological Networks Gene Ontology tool*) (Saito *et al.*, 2012; Maere *et al.*, 2005; <http://www.cytoscape.org/>). Para la generación de los perfiles de interacción se combinó literatura relacionada y anotaciones funcionales depositadas en bases de datos como **Gene Ontology** (Ashburner *et al.*, 2002; <http://www.geneontology.org/>), **YOGY** (Penkett *et al.*, 2006; <http://128.40.79.33/YOGY/>), **BioGrid-Database of Protein and Genetic Interactions** (Breitkreutz *et al.*, 2003; <http://thebiogrid.org/>), **DRYGIN-Data Repository of Yeast Genetic Interactions** (Koh *et al.*, 2010; <http://drygin.cabr.utoronto.ca/>), **Biobase Biological Database** (<http://www.biobase-international.com>), **Pombase-The Scientific Resource for Fission Yeast** (Wood *et al.*, 2012; <http://www.pombase.org/>) y **SGD-Sacharomyces Genome Database** (Cherry *et al.*, 1998; <http://www.yeastgenome.org/>). Para la predicción de las redes se empleó la herramienta PInt (Pancaldi *et al.*, 2012; <http://www.bahlerlab.info/>).

### 13.2 Análisis de secuencias

Las secuencias de ADN y proteína se obtuvieron de las bases de datos Pombase (Wood *et al.*, 2012), SwissProt (<http://www.expasy.org/prot/>), Prosite (<http://www.expasy.org/prosite/>) y Sanger (<http://www.sanger.ac.uk>). Se analizaron utilizando los programas 4Peaks (Mekentosj) EditSeq (DNASTAR Inc.), Seqman (DNASTAR Inc.) y Serial Cloner 1-3 (<http://serialbasics.free.fr/Softwares.html>). Para el alineamiento de las secuencias de proteína, se empleó el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

### 13.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 19 para Mac.

## **Materiales y Métodos**

### **13.4 Presentación de datos**

Para las presentaciones gráficas se emplearon Excel 2011 para Mac (Microsoft Corporation), Powerpoint 2011 para Mac (Microsoft Corporation), Inkscape 2.3.6 (X Window system) y Illustrator CS4 (Adobe) Para digitalizar las imágenes se utilizaron los escáneres ScanMaker i900 MICROTEx y HP Scanjet G4050. Las imágenes de las tinciones celulares con calcoflúor y DAPI se procesaron con el programa ImageJ 1.45K (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) y se editaron utilizando Photoshop CS4 (Adobe). Las

# Bibliografía

- Aligue R, Wu L, Russell P.** (1997). Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Wee1 tyrosine kinase. *J Biol Chem* **272**: 13320-13325.
- al-Khodairy F, Carr AM.** (1992). DNA repair mutants defining G2 checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* **11**: 1343-1350.
- al-Khodairy F, Fotou E, Sheldrick KS, Griffiths DJ, Lehmann AR, Carr AM.** (1994). Identification and characterization of new elements involved in checkpoint and feedback controls in fission yeast. *Mol Biol Cell* **5**: 147-160.
- Alvarez B, Moreno S.** (2006). Fission yeast Tor2 promotes cell growth and represses cell differentiation. *J Cell Sci.* **119**: 4475-4485.
- Amano M, Suzuki A, Hori T, Backer C, Okawa K, Cheeseman IM, Fukagawa T.** (2009). The CENP-S complex is essential for the stable assembly of outer kinetochore structure. *J Cell Biol* **186**: 173-182.
- Archambault V, Zhao X, White-Cooper H, Carpenter AT, Glover DM.** (2007). Mutations in *Drosophila* Greatwall/Scant reveal its roles in mitosis and meiosis and interdependence with Polo kinase. *PLoS Genet* **3**: e200.
- Arellano M, Moreno S.** (1997). Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 559-573.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, et al.** (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**: 25-29.
- Aslett M, Wood V.** (2006). Gene Ontology annotation status of the fission yeast genome: preliminary coverage approaches 100%. *Yeast* **23**: 913-919.
- Baber-Furnari BA, Rhind N, Boddy MN, Shanahan P, Lopez-Girona A, Russell P.** (2000). Regulation of mitotic inhibitor Mik1 helps to enforce the DNA damage checkpoint. *Mol Biol Cell* **11**: 1-11.
- Bähler J, Nurse P.** (2001). Fission yeast Pom1p kinase activity is cell cycle regulated and essential for cellular symmetry during growth and division. *EMBO J* **20**: 1064-1073.
- Bähler J, Wu JQ, Longtine MS, Shah NG, McKenzie A 3rd, Steever AB, Wach A, Philippsen P, Pringle JR.** (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**: 943-951.
- Baryshnikova A, Costanzo M, Dixon S, Vizeacoumar FJ, Myers CL, Andrews B, Boone C.** (2010). Synthetic genetic array (SGA) analysis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **470**: 145-179.
- Benito J, Martín-Castellanos C, Moreno S.** (1998). Regulation of the G1 phase of the cell cycle by periodic stabilization and degradation of the p25<sup>rum1</sup> CDK inhibitor. *EMBO J* **17**: 482-497.
- Bernal M, Sanchez-Romero MA, Salas-Pino S, Daga RR.** (2012). Regulation of fission yeast morphogenesis by PP2A activator pta2. *PLoS One* **7**: e32823.

## Bibliografía

- Bettencourt-Dias M, Giet R, Sinka R, Mazumdar A, Lock WG, Balloux F, Zafiropoulos PJ, Yamaguchi S, Winter S, Carthew RW, Cooper M, Jones D, Frenz L, Glover DM.** (2004). Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. *Nature* **432**: 980-987.
- Bhattacharjee S, Osman F, Feeney L, Lorenz A, Bryer C, Whitby MC.** (2013). MHF1-2/CENP-S-X performs distinct roles in centromere metabolism and genetic recombination. *Open Biol* **3**: 130102.
- Bimbó A, Jia Y, Poh SL, Karuturi RK, den Elzen N, Peng X, Zheng L, O'Connell M, Liu ET, Balasubramanian MK, Liu J.** (2005). Systematic deletion analysis of fission yeast protein kinases. *Eukaryot Cell* **4**: 799-813.
- Binns D, Dimmer E, Huntley R, Barrell D, O'Donovan C, Apweiler R.** (2009). QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. *Bioinformatics* **25**: 3045-3046.
- Blanco MA, Sánchez-Díaz A, de Prada JM, Moreno S.** (2000). APC(ste9/srw1) promotes degradation of mitotic cyclins in G(1) and is inhibited by cdc2 phosphorylation. *EMBO J* **19**: 3945-3955.
- Blanco MA.** (2001). Tesis Doctoral. Regulación de Ste9 y Mfr1, dos activadores del complejo APC en *Schizosaccharomyces pombe*. *Departamento de Microbiología y Genética*. Universidad de Salamanca, Salamanca.
- Boke E, Hagan IM.** (2011). Polo, greatwall, and protein phosphatase PP2A Jostle for pole position. *PLoS Genet* **7**: e1002213.
- Bone N, Millar JB, Toda T, Armstrong J.** (1998). Regulated vacuole fusion and fission in *Schizosaccharomyces pombe*: an osmotic response dependent on MAP kinases. *Curr Biol* **8**: 135-144.
- Bontron S, Jaquenoud M, Vaga S, Talarek N, Bodenmiller B, Aebersold R, De Virgilio C.** (2013). Yeast endosulfines control entry into quiescence and chronological life span by inhibiting protein phosphatase 2A. *Cell Rep* **3**: 16-22.
- Booher R, Beach D.** (1986). Site-specific mutagenesis of cdc2+, a cell cycle control gene of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **6**: 3523-3530.
- Booher R, Beach D.** (1987). Interaction between cdc13+ and cdc2+ in the control of mitosis in fission yeast; dissociation of the G1 and G2 roles of the cdc2+ protein kinase. *EMBO J* **6**: 3441-3447.
- Booher R, Beach D.** (1989). Involvement of a type 1 protein phosphatase encoded by bws1+ in fission yeast mitotic control. *Cell* **57**: 1009-1016.
- Breeding CS, Hudson J, Balasubramanian MK, Hemmingsen SM, Young PG, Gould KL.** (1998). The cdr2(+) gene encodes a regulator of G2/M progression and cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **9**: 3399-3415.
- Breitkreutz BJ, Stark C, Tyers M.** (2003). The GRID: the General Repository for Interaction Datasets. *Genome Biol* **4**: R23.

- Budovskaya YV, Stephan JS, Deminoff SJ, Herman PK.** (2005). An evolutionary proteomics approach identifies substrates of the cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 13933-13938.
- Bueno A, Richardson H, Reed SI, Russell P.** (1991). A fission yeast B- type cyclin functioning early in the cell cycle. *Cell* **66**: 149-159. Erratum in: *Cell* (1993) **73**: 1049.
- Bueno A, Russell P.** (1993). Two fission yeast B-type cyclins, cig2 and Cdc13, have different functions in mitosis. *Mol Cell Biol* **13**: 2286-2297. Erratum in: *Mol Cell Biol* (1994) **14**: 869.
- Burgess A, Vigneron S, Brioude E, Labbé JC, Lorca T, Castro A.** (2010). Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 12564-12569.
- Byrne AB, Weirauch MT, Wong V, Koeva M, Dixon SJ, Stuart JM, Roy PJ.** (2007). A global analysis of genetic interactions in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol* **6**: 8.
- Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S; AmiGO Hub; Web Presence Working Group.** (2009). AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* **25**: 288-289.
- Carr AM, MacNeill SA, Hayles J, Nurse P.** (1989). Molecular cloning and sequence analysis of mutant alleles of the fission yeast cdc2 protein kinase gene: implications for cdc2+ protein structure and function. *Mol Gen Genet* **218**: 41-49.
- Castilho, P. V., Williams, B. C., Mochida, S., Zhao, Y., Goldberg, M. L.** (2009). The M phase kinase Greatwall (Gwl) promotes inactivation of PP2A/B55 $\delta$ , a phosphatase directed against CDK phosphosites. *Mol Biol Cell* **20**: 4777-4789.
- Cheeseman IM, Brew C, Wolyniak M, Desai A, Anderson S, Muster N, Yates JR, Huffaker TC, Drubin DG, Barnes G.** (2001). Implication of a novel multiprotein Dam1p complex in outer kinetochore function. *J Cell Biol* **155**: 1137-1145.
- Chen BR, Li Y, Eisenstatt JR, Runge KW.** (2013). Identification of a lifespan extending mutation in the *Schizosaccharomyces pombe* cyclin gene clg1+ by direct selection of long-lived mutants. *PLoS One* **8**: e69084.
- Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, Brazma A, Jones N, Bähler J.** (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* **14**: 214-229.
- Cherry JM, Adler C, Ball C, Chervitz SA, Dwight SS, Hester ET, Jia Y, Juvik G, Roe T, Schroeder M, et al.** (1998). SGD: *Saccharomyces* Genome Database. *Nucleic Acids Res* **26**: 73-79.
- Collins SR, Schuldiner M, Krogan NJ, Weissman JS.** (2006). A strategy for extracting and analyzing large-scale quantitative epistatic interaction data. *Genome Biol* **7**: R63.
- Collins SR, Roguev A, Krogan NJ.** (2010). Quantitative genetic interaction mapping using

## Bibliografía

- mapping the E-MAP approach. *Methods Enzymol* **470**: 205-231.
- Correa-Bordes J, Gulli MP, Nurse P.** (1997). p25rum1 promotes proteolysis of the mitotic B-cyclin p56cdc13 during G1 of the fission yeast cell cycle. *EMBO J* **16**: 4657-4664.
- Costanzo M, Baryshnikova A, Bellay J, Kim Y, Spear ED, Sevier CS, Ding H, Koh JL, Toufighi K, Mostafavi S, et al.** (2010). The genetic landscape of a cell. *Science* **327**: 425-431.
- Costello, G., Rodgers, L., Beach, D.** (1986). Fission yeast enters the stationary phase G0 state from either mitotic G1 or G2. *Curr genet* **11**: 119-125.
- Coudreuse D, Nurse P.** (2010). Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature* **468**:1074-1079.
- Cueille N, Salimova E, Esteban V, Blanco M, Moreno S, Bueno A, Simanis V.** (2001). Flp1, 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.
- Damagnez V, Mäkelä TP, Cottarel G.** (1995). *Schizosaccharomyces pombe* Mop1-Mcs2 is related to mammalian CAK. *EMBO J* **14**: 6164-6172.
- Deng L, Moseley JB.** (2013). Compartmentalized nodes control mitotic entry signaling in fission yeast. *Mol Biol Cell* **24**:1872-1881.
- Dixon SJ, Fedyshyn Y, Koh JL, Prasad TS, Chahwan C, Chua G, Toufighi K, Baryshnikova A, Hayles J, Hoe KL, et al.** (2008). Significant conservation of synthetic lethal genetic interaction networks between distantly related eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 16653-16658.
- Dixon SJ, Andrews BJ, Boone C.** (2009).\_Exploring the conservation of synthetic lethal genetic interaction networks. *Commun Integr Biol* **2**: 78-81.
- Domingo-Sananes MR, Kapuy O, Hunt T, Novak B.** (2011). Switches and latches: a biochemical tug-of-war between the kinases and phosphatases that control mitosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**: 3584-3594.
- Domínguez-Kelly R, Martín Y, Koundrioukoff S, Tanenbaum ME, Smits VA, Medema RH, Debatisse M, Freire R.** (2011). Wee1 controls genomic stability during replication by regulating the Mus81-Eme1 endonuclease. *J Cell Biol* **194**: 567-579.
- Ducommun B, Brambilla P, Félix MA, Franza BR Jr, Karsenti E, Draetta G.** (1991). Cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin. *EMBO J* **10**: 3311-3319.
- Egel, R.** (1989). Mating-type genes, meiosis and sporulation, In *The Molecular Biology of Fission Yeast* (eds E. Nasim, P. Young, B. Johnson) pp 31-77. New York. Academic Press.
- Egel R.** (2004). DNA Replication: Stalling a fork for imprinting and switching. *Curr Biol* **14**: 915-917. Review.

- Eichhorn PJ, Creighton MP, Bernards R.** (2009). Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1795**: 1-15.
- Enoch T, Nurse P.** (1990). Mutation of fission yeast cell cycle control genes abolishes dependence of mitosis on DNA replication. *Cell* **60**: 665-73.
- Enoch T, Nurse P.** (1991). Coupling M phase and S phase: controls maintaining the dependence of mitosis on chromosome replication. *Cell* **65**: 921-923. Review.
- Enoch T, Carr AM, Nurse P.** (1992). Fission yeast genes involved in coupling mitosis to completion of DNA replication. *Genes Dev* **6**: 2035-2046.
- Esteban V, Blanco M, Cueille N, Simanis V, Moreno S, Bueno A.** (2004). A role for the Cdc14-family phosphatase Fip1p at the end of the cell cycle in controlling the rapid degradation of the mitotic inducer Cdc25p in fission yeast. *J Cell Sci* **117**: 2461-2468.
- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T.** (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**: 389-96.
- Fantes P, Nurse P.** (1977). Control of cell size at division in fission yeast by a growth-modulated size control over nuclear division. *Exp Cell Res* **107**: 377-386.
- Fantes PA.** (1977). Control of cell size and cycle time in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **24**: 51-67.
- Fantes P.** (1979). Epistatic gene interactions in the control of division in fission yeast. *Nature* **279**: 428-430.
- Fantes PA.** (1981). Isolation of cell size mutants of a fission yeast by a new selective method: characterization of mutants and implications for division control mechanisms. *J Bacteriol* **146**: 746-754.
- Featherstone C, Russell P.** (1991). Fission yeast p107wee1 mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase. *Nature* **349**: 808-811.
- Fernández MA, Rueda C, Peddada SD.** (2012). Identification of a core set of signature cell cycle genes whose relative order of time to peak expression is conserved across species. *Nucleic Acids Res* **40**: 2823-2832.
- Fisher DL, Nurse P.** (1995). Cyclins of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Semin Cell Biol* **6**: 73-78.
- Fisher DL, Nurse P.** (1996). 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.
- Fisher DL, Krasinska L, Coudreuse D, Novak B.** (2012). Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *J Cell Sci* **125**: 4703-4711. Review.
- Fleig UN, Gould KL, Nurse P.** (1992). A dominant negative allele of p34cdc2 shows altered phosphoamino acid content and sequesters p56cdc13 cyclin. *Mol Cell Biol* **12**: 2295-2301.

## Bibliografia

- Foiani M, Marini F, Gamba D, Lucchini G, Plevani P.** (1994). 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.
- Forsburg SL, Nurse P.** (1991). Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Cell Biol* **7**: 227-256. Review.
- Forsburg SL.** (1993). Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res* **21**: 2955-2956.
- Forsburg SL.** (2005). The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. *Gravit Space Biol Bull* **18**: 3-9.
- Frost A, Elgort MG, Brandman O, Ives C, Collins SR, Miller-Vedam L, Weibezahn J, Hein MY, Poser I, Mann M, et al.** (2012). Functional repurposing revealed by comparing *S. pombe* and *S. cerevisiae* genetic interactions. *Cell* **149**: 1339-1352.
- Furnari B, Rhind N, Russell P.** (1997). Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* **277**:1495-1497.
- Garabedian MV, Noguchi C, Ziegler MA, Das MM, Singh T, Harper LJ, Leman AR, Khair L, Moser BA, Nakamura TM, Noguchi E.** (2012). The double-bromodomain proteins Bdf1 and Bdf2 modulate chromatin structure to regulate S-phase stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **190**: 487-500.
- Gharbi-Ayachi A, Labbé JC, Burgess A, Vigneron S, Strub JM, Brioude E, Van-Dorsseleer A, Castro A, Lorca T.** (2010). The substrate of Greatwall kinase, Arpp19, controls mitosis by inhibiting protein phosphatase 2A. *Science* **330**: 1673-1677.
- Gong Y, Kakihara Y, Krogan N, Greenblatt J, Emili A, Zhang Z, Houry WA.** (2009). An atlas of chaperone-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*: implications to protein folding pathways in the cell. *Mol Syst Biol* **5**:275.
- Gould KL, Nurse P.** (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**: 39-45.
- Gould KL, Moreno S, Owen DJ, Sazer S, Nurse P.** (1991). Phosphorylation at Thr167 is required for *Schizosaccharomyces pombe* p34cdc2 function. *EMBO* **10**: 3297-3309.
- Goyal A, Simanis V.** (2012). Characterization of ypa1 and ypa2, the *Schizosaccharomyces pombe* orthologs of the peptidyl prolyl isomerases that activate PP2A, reveals a role for Ypa2p in the regulation of cytokinesis. *Genetics* **190**: 1235-1250.
- Grallert A, Connolly Y, Smith DL, Simanis V, Hagan IM.** (2012).The *S. pombe* cytokinesis NDR kinase Sid2 activates Fin1 NIMA kinase to control mitotic commitment through Pom1/Wee1. *Nat Cell Biol* **14**: 738-745.
- Grallert A, Chan KY, Alonso-Nuñez ML, Madrid M, Biswas A, Alvarez-Tabarés I, Connolly Y, Tanaka K, Robertson A, Ortiz JM, et al.** (2013). Removal of centrosomal PP1 by NIMA kinase unlocks the MPF feedback loop to promote mitotic commitment in *S. pombe*. *Curr Biol* **23**: 213-222.

- Hagan I, Hayles J, Nurse P.** (1988). 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.
- Hanyu Y, Imai KK, Kawasaki Y, Nakamura T, Nakaseko Y, Nagao K, Kokubu A, Ebe M, Fujisawa A, Hayashi T, Obuse C, Yanagida M.** (2009). *Schizosaccharomyces pombe* cell division cycle under limited glucose requires Ssp1 kinase, the putative CaMKK, and Sds23, a PP2A-related phosphatase inhibitor. *Genes Cells* **14**: 539-554.
- Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K.** (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* **110**: 177-189.
- Harlow E, Lane D.** (1988). Adjuvants. In *Antibodies: A Laboratory Manual*. (eds E. Harlow, D Lane) pp 96-124. Cold Spring Harbor N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hartmuth S, Petersen J.** (2009). Fission yeast Tor1 functions as part of TORC1 to control mitotic entry through the stress MAPK pathway following nutrient stress. *J Cell Sci* **122**: 1737-1746.
- Hartwell LH, Weinert TA.** (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. **246**: 629-634. Review.
- Hauf S, Roitinger E, Koch B, Dittrich CM, Mechtler K, Peters JM.** (2005). Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol* **3**: e69.
- He X, Jones MH, Winey M, Sazer S.** (1998). Mph1, a member of the Mps1-like family of dual specificity protein kinases, is required for the spindle checkpoint in *S. pombe*. *J Cell Sci* **111**: 1635-1647.
- Heitman J, Movva NR, Hall MN.** (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**: 905-909.
- Higuchi T, Uhlmann F.** (2005). Stabilization of microtubule dynamics at anaphase onset promotes chromosome segregation. *Nature* **433**: 171-176.
- Hoffmann I, Clarke PR, Marcote MJ, Karsenti E, Draetta G.** (1993). Phosphorylation and activation of human *cdc25-C* by *cdc2*-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J* **12**: 53-63.
- Hogan CJ, Aligianni S, Durand-Dubief M, Persson J, Will WR, Webster J, Wheeler L, Mathews CK, Elderkin S, Oxley D, et al.** (2010). Fission yeast *lec1-ino80*-mediated nucleosome eviction regulates nucleotide and phosphate metabolism. *Mol Cell Biol* **30**: 657-674.
- Holmes DS, Quigley M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**: 193-197.
- Ikai N, Nakazawa N, Hayashi T, Yanagida M.** (2011). The reverse, but coordinated, roles of Tor2 (TORC1) and Tor1 (TORC2) kinases for growth, cell cycle and separase-mediated mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Open Biol* **1**: 110007.

## Bibliografia

- Inoue H, Nojima H, Okayama H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Irrarrazabal CE, Liu JC, Burg MB, Ferraris JD.** (2004). ATM, a DNA damage-inducible kinase, contributes to activation by high NaCl of the transcription factor TonEBP/OREBP. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 8809-8814.
- Jacinto E.** (2008). What controls TOR? *IUBMB Life* **60**: 483-496. Review.
- Jang YJ, Won M, Yoo HS.** (2013). Phosphorylations of Sds23/Psp1/Moc1 by stress-activated kinase and cAMP-dependent kinase are essential for regulating cell viability in prolonged stationary phase. *Yeast* **30**: 379-394.
- Janssens V, Goris J.** (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* **353**: 417-439. Review.
- Janssens V, Longin S, Goris J.** (2008). PP2A holoenzyme assembly: in *cauda venenum* (the sting is in the tail). *Trends Biochem Sci* **33**: 113-121.
- Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massagué J, Pavletich NP.** (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**: 313-320.
- Jiang W, Hallberg RL.** (2000). Isolation and characterization of par1(+) and par2(+): two *Schizosaccharomyces pombe* genes encoding B' subunits of protein phosphatase 2A. *Genetics* **154**: 1025-1038.
- Jiang W, Hallberg RL.** (2001). Correct regulation of the septation initiation network in *Schizosaccharomyces pombe* requires the activities of par1 and par2. *Genetics* **158**: 1413-1429.
- Jiang Y.** (2006). Regulation of the cell cycle by protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 440-449. Review.
- Jimenez G, Yucel J, Rowley R, Subramani S.** (1992). The rad3+ gene of *Schizosaccharomyces pombe* is involved in multiple checkpoint functions and in DNA repair. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4952-4956.
- Jourdain I, Brzezińska EA, Toda T.** (2013). Fission yeast Nod1 is a component of cortical nodes involved in cell size control and division site placement. *PLoS One* **8**: e54142.
- Juanes MA, Khoueiry R, Kupka T, Castro A, Mudrak I, Ogris E, Lorca T, Piatti S.** (2013). Budding yeast greatwall and endosulfines control activity and spatial regulation of PP2A(Cdc55) for timely mitotic progression. *PLoS Genet* **9**: e1003575.
- Kakizuka, A., Miller, W. H., Jr, Umesono, K., Warrell, R. P., Jr, Frankel, S. R., Murty, V. V., Dmitrovsky, E. Evans, R. M.** (1991). Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* **66**: 663-674.
- Kanoh J, Russell P.** (1998). The protein kinase Cdr2, related to Nim1/Cdr1 mitotic inducer,

- regulates the onset of mitosis in fission yeast. *Mol Biol Cell* **9**: 3321-3334.
- Kaur R, Kostrub CF, Enoch T.** (2001). Structure-function analysis of fission yeast Hus1-Rad1-Rad9 checkpoint complex. *Mol Biol Cell* **12**: 3744-3758.
- Kawamukai M, Ferguson K, Wigler M, Young D.** (1991). Genetic and biochemical analysis of the adenylyl cyclase of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Regul* **2**: 155-164.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM.** (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**: 163-175.
- Kim DU, Hayles J, Kim D, Wood V, Park HO, Won M, Yoo HS, Duhig T, Nam M, Palmer G, Han S, et al.** (2010). Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol* **28**:617-623. Erratum in: *Nat Biotechnol.* (2010) **28**: 1308.
- Kinoshita N, Ohkura H, Yanagida M.** (1990). Distinct, essential roles of type 1 and 2A protein phosphatases in the control of the fission yeast cell division cycle. *Cell* **63**: 405-415.
- Kinoshita N, Yamano H, Niwa H, Yoshida T, Yanagida M.** (1993). Negative regulation of mitosis by the fission yeast protein phosphatase ppa2. *Genes Dev* **7**: 1059-1071.
- Kinoshita K, Nemoto T, Nabeshima K, Kondoh H, Niwa H, Yanagida M.** (1996). The regulatory subunits of fission yeast protein phosphatase 2A (PP2A) affect cell morphogenesis, cell wall synthesis and cytokinesis. *Genes Cells* **1**: 29-45.
- Kishimoto N, Yamashita I.** (2000). Cyclic AMP regulates cell size of *Schizosaccharomyces pombe* through Cdc25 mitotic inducer. *Yeast* **16**: 523-529.
- Kitajima TS, Sakuno T, Ishiguro K, Iemura S, Natsume T, Kawashima SA, Watanabe Y.** (2006). Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* **441**: 46-52.
- Kitamura K, Maekawa H, Shimoda C.** (1998). 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.
- Knutsen JH, Rein ID, Rothe C, Stokke T, Grallert B, Boye E.** (2011). Cell-cycle analysis of fission yeast cells by flow cytometry. *PLoS One.* **6**: e17175.
- Koh JL, Ding H, Costanzo M, Baryshnikova A, Toufighi K, Bader GD, Myers CL, Andrews BJ, Boone C.** (2010). DRYGIN: a database of quantitative genetic interaction networks in yeast. *Nucleic Acids Res* **38**: D502-7.
- Koyano T, Kume K, Konishi M, Toda T, Hirata D.** (2010). Search for kinases related to transition of growth polarity in fission yeast. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**: 1129-1133.
- Kushner SR.** (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with Col El derived plasmids. In: *Genetic Engineering* (eds HW Boyer, S Nicosia) pp. 17- 23.

## Bibliografía

Amsterdam. Elsevier/North Holland.

- Lahoz A, Alcaide-Gavilán M, Daga RR, Jimenez J.** (2010). Antagonistic roles of PP2A-Pab1 and Etd1 in the control of cytokinesis in fission yeast. *Genetics* **186**: 1261-1270.
- Lang BF, Cedergren R, Gray MW.** (1987). The mitochondrial genome of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. sequence of the large-subunit ribosomal RNA gene, comparison of potential secondary structure in fungal mitochondrial large-subunit rRNAs and evolutionary considerations. *Eur J Biochem* **169**: 527-537.
- Lee KM, Saiz JE, Barton WA, Fisher RP.** (1999). Cdc2 activation in fission yeast depends on Mcs6 and Csk1, two partially redundant Cdk-activating kinases (CAKs). *Curr Biol* **9**: 441-444.
- Lee MS, Enoch T, Piwnicka-Worms H.** (1994). mik1+ encodes a tyrosine kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *J Biol Chem* **269**: 30530-30537.
- Liu J, Wang H, Balasubramanian MK.** (2000). A checkpoint that monitors cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **113**: 1223-1230.
- Liu X, McLeod I, Anderson S, Yates JR 3rd, He X.** (2005). Molecular analysis of kinetochore architecture in fission yeast. *EMBO J* **24**: 2919-2930.
- López-Avilés S, Grande M, González M, Helgesen AL, Alemany V, Sanchez-Piris M, Bachs O, Millar JB, Aligue R.** (2005). Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress-activated Srk1 kinase in fission yeast. *Mol Cell* **17**: 49-59.
- López-Girona A, Furnari B, Mondesert O, Russell P.** (1999). Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* **397**: 172-175.
- Lu LX, Domingo-Sananes MR, Huzarska M, Novak B, Gould KL.** (2012). Multisite phosphoregulation of Cdc25 activity refines the mitotic entrance and exit switches. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 9899-9904.
- Lundgren K, Walworth N, Booher R, Dembski M, Kirschner M, Beach D.** (1991). mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell*. **64**: 1111-1122.
- Luo X, Talarek N, De Virgilio C.** (2011). Initiation of the yeast G0 program requires Igo1 and Igo2, which antagonize activation of decapping of specific nutrient-regulated mRNAs. *RNA Biol* **8**: 14-17.
- Mach KE, Furge KA, Albright CF.** (2000). Loss of Rhb1, a Rheb-related GTPase in fission yeast, causes growth arrest with a terminal phenotype similar to that caused by nitrogen starvation. *Genetics* **155**: 611-622.
- MacNeill SA, Nurse P.** (1989). Genetic interactions in the control of mitosis in fission yeast. *Curr Genet* **16**: 1-6. Review.
- MacNeill, S.A. and Nurse, P.** (1997). Cell cycle control in fission yeast. In: *The Molecular and Cellular Biology of Yeast* (eds JR Pringle, JR Broach, EW Jones) pp. 697-763. Cold Spring Harbor N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Madrid M, Soto T, Franco A, Paredes V, Vicente J, Hidalgo E, Gacto M, Cansado J.** (2004). A cooperative role for Atf1 and Pap1 in the detoxification of the oxidative stress induced by glucose deprivation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **279**: 41594-41602.
- Madrid M, Soto T, Khong HK, Franco A, Vicente J, Pérez P, Gacto M, Cansado J.** (2006). Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **281**: 2033-2043.
- Maeda T, Mochizuki N, Yamamoto M.** (1990). Adenylyl cyclase is dispensable for vegetative cell growth in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7814-7818.
- Maeda T, Watanabe Y, Kunitomo H, Yamamoto M.** (1994). Cloning of the pka1 gene encoding the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **269**: 9632-9637.
- Maere S, Heymans K, Kuiper M.** (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* **21**: 3448-3449.
- Manchado E, Guillamot M, de Cárcer G, Eguren M, Trickey M, García-Higuera I, Moreno S, Yamano H, Cañamero M, Malumbres M.** (2010). Targeting mitotic exit leads to tumor regression in vivo: Modulation by Cdk1, Mastl, and the PP2A/B55 $\alpha$ , $\delta$  phosphatase. *Cancer Cell* **18**: 641-654.
- Mani R, St Onge RP, Hartman JL 4th, Giaever G, Roth FP.** (2008). Defining genetic interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 3461-3466.
- Martin SG, Berthelot-Grosjean M.** (2009). Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle. *Nature* **459**: 852-856.
- Martín-Castellanos C, Blanco MA, de Prada JM, Moreno S.** (2000). The puc1 cyclin regulates the G1 phase of the fission yeast cell cycle in response to cell size. *Mol Biol Cell* **11**: 543-54.
- Martín-Castellanos C, Blanco M, Rozalén AE, Pérez-Hidalgo L, García AI, Conde F, Mata J, Ellermeier C, Davis L, San-Segundo P, et al** (2005). A large-scale screen in *S. pombe* identifies seven novel genes required for critical meiotic events. *Curr Biol* **15**: 2056-2062.
- Masuda H, Fong CS, Ohtsuki C, Haraguchi T, Hiraoka Y.** (2011). Spatiotemporal regulations of Wee1 at the G2/M transition. *Mol Biol Cell* **22**: 555-569.
- Matsuo T, Kubo Y, Watanabe Y, Yamamoto M.** (2003). *Schizosaccharomyces pombe* AGC family kinase Gad8p forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. *EMBO J* **22**: 3073-3083.
- Matsuo T, Otsubo Y, Urano J, Tamanoi F, Yamamoto M.** (2007). Loss of the TOR kinase Tor2 mimics nitrogen starvation and activates the sexual development pathway in fission yeast. *Mol Cell Biol* **27**: 3154-3164.

## Bibliografia

- Matsuzawa T, Fujita Y, Tohda H, Takegawa K.** (2012). Snf1-like protein kinase Ssp2 regulates glucose derepression in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **11**:159-167.
- Maundrell K.** (1990). nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem* **265**: 10857-10864.
- Maundrell K.** (1993). Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. **123**: 127-130.
- Millar JB, McGowan CH, Lenaers G, Jones R, Russell P.** (1991). p80cdc25 mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34cdc2 kinase in fission yeast. *EMBO J* **10**: 4301-4309.
- Millar JB, Lenaers G, Russell P.** (1992). Pyp3 PTPase acts as a mitotic inducer in fission yeast. *EMBO J* **11**: 4933-4941.
- Mirchenko L, Uhlmann F.** (2010). Sli15(INCENP) dephosphorylation prevents mitotic checkpoint reengagement due to loss of tension at anaphase onset. *Curr Biol* **20**: 1396-1401.
- Mitchison JM, Creanor J.** (1971). Further measurements of DNA synthesis and enzyme potential during cell cycle of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Exp Cell Res* **69**: 244–247.
- Mitchison JM.** (2003). Growth during the cell cycle. *Int Rev Cytol* **226**: 165-258. Review.
- Mochida S, Ikeo S, Gannon J, Hunt T.** (2009). Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J*. **28**: 2777-2785.
- Mochida S, Maslen SL, Skehel M, Hunt T.** (2010). Greatwall phosphorylates an inhibitor of protein phosphatase 2A that is essential for mitosis. *Science* **330**: 1670-1673.
- Mochida S, Hunt T.** (2012). Protein phosphatases and their regulation in the control of mitosis. *EMBO Rep* **13**: 197-203.
- Mochida, S.** (2013), Regulation of  $\alpha$ -endosulfine, an inhibitor of protein phosphatase 2A, by multisite phosphorylation. *FEBS J* **281**:1159–1169.
- Mondesert O, McGowan CH, Russell P.** (1996). Cig2, a B-type cyclin, promotes the onset of S in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **16**: 1527-33.
- Moreno S, Hayles J, Nurse P.** (1989). Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis. *Cell* **58**: 361-372.
- Moreno S, Nurse P, Russell P.** (1990). Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80cdc25 mitotic inducer in fission yeast. *Nature* **344**: 549-552.
- Moreno S, Klar A, Nurse P.** (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**: 795-823.

- Moreno S, Nurse P.** (1994). Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the *rum1+* gene. *Nature* **367**: 236-242.
- Morgan DO.** (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 261-291. Review.
- Morgan DO.** (2007). The cell cycle: principles of control (pp 297). Primers in biology series. London. New Science Press Ltd.
- Morrell JL, Nichols CB, Gould KL.** (2004). The GIN4 family kinase, Cdr2p, acts independently of septins in fission yeast. *J Cell Sci* **117**: 5293-5302.
- Moseley JB, Mayeux A, Paoletti A, Nurse P.** (2009). A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature* **459**:857-860.
- Moseley JB, Nurse P.** (2009). Cdk1 and cell morphology: connections and directions. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 82-88.
- Mulvihill DP, Petersen J, Ohkura H, Glover DM, Hagan IM.** (1999). Plo1 kinase recruitment to the spindle pole body and its role in cell division in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **10**: 2771-2785.
- Nakashima A, Sato T, Tamanoi F.** (2010). Fission yeast TORC1 regulates phosphorylation of ribosomal S6 proteins in response to nutrients and its activity is inhibited by rapamycin. *J Cell Sci* **123**: 777-786.
- Navarro FJ, Nurse P.** (2012). A systematic screen reveals new elements acting at the G2/M cell cycle control. *Genome Biol* **13**: R36.
- Nefsky B, Beach D.** (1996). Pub1 acts as an E6-AP-like protein ubiquitin ligase in the degradation of *cdc25*. *EMBO J* **15**: 1301-1312.
- Ng SS, Anderson M, White S, McInerney CJ.** (2001). *mik1+* G1-S transcription regulates mitotic entry in fission yeast. *FEBS Lett* **503**: 131-134.
- Nguyen AN, Shiozaki K.** (1999). Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. *Genes Dev* **13**: 1653-1663.
- Novak B, Vinod PK, Freire P, Kapuy O.** (2010a). Systems-level feedback in cell-cycle control. *Biochem Soc Trans* **38**: 1242-1246. Review. Erratum in: *Biochem Soc Trans* (2010) **38**:1723.
- Novak B, Kapuy O, Domingo-Sananes MR, Tyson JJ.** (2010b). Regulated protein kinases and phosphatases in cell cycle decisions. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 801-808.
- Nurse P.** (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* **256**: 547-551.
- Nurse P, Thuriaux P, Nasmyth K.** (1976). Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **146**: 167-78.
- Nurse P, Thuriaux P.** (1977). Controls over the timing of DNA replication during the cell

## Bibliografia

- cycle of fission yeast. *Exp Cell Res* **107**: 365-375.
- Nurse P, Thuriaux P.** (1980). Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **96**: 627-37.
- Nurse P.** (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**: 503-508. Review.
- O'Connell MJ, Raleigh JM, Verkade HM, Nurse P.** (1997). Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J* **16**: 545-554.
- Ohtaki A, Noguchi K, Yohda M.** (2010). Structure and function of archaeal prefoldin, a co-chaperone of group II chaperonin. *Front Biosci* (Landmark Ed) **15**:708-717. Review.
- Otsubo Y, Yamamoto M.** (2008). TOR signaling in fission yeast. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **43**: 277-283. Review. **Pal G, Paraz MT, Kellogg DR.** (2008). Regulation of Mih1/Cdc25 by protein phosphatase 2A and casein kinase 1. *J Cell Biol* **180**: 931-945.
- Pan X, Yuan DS, Xiang D, Wang X, Sookhai-Mahadeo S, Bader JS, Hieter P, Spencer F, Boeke JD.** (2004). A robust toolkit for functional profiling of the yeast genome. *Mol Cell* **16**: 487-496.
- Pancaldi V, Saraç OS, Rallis C, McLean JR, Převorovský M, Gould K, Beyer A, Bähler J.** (2012). Predicting the fission yeast protein interaction network. *G3 (Bethesda)* **2**: 453-467.
- Paoletti A, Chang F.** (2000). Analysis of mid1p, a protein required for placement of the cell division site, reveals a link between the nucleus and the cell surface in fission yeast. *Mol Biol Cell* **11**: 2757-2773.
- Parker LL, Walter SA, Young PG, Piwnica-Worms H.** (1993). Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor Wee1 by the nim1/cdr1 kinase. *Nature*. **363**: 736-738.
- Parrilla-Castellar ER, Arlander SJ, Karnitz L.** (2004). Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA Repair* **3**: 1009-1014.
- Pavletich NP.** (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk's, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* **287**: 821-828.
- Pedrucci I, Dubouloz F, Cameroni E, Wanke V, Roosen J, Winderickx J, De Virgilio C.** (2003). TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0. *Mol Cell* **12**: 1607-1613.
- Penkett CJ, Morris JA, Wood V, Bähler J.** (2006). YOGY: a web-based, integrated database to retrieve protein orthologs and associated Gene Ontology terms. *Nucleic Acids Res* **34**: W330-334.
- Pérez P, Cansado J.** (2010). Cell integrity signaling and response to stress in fission yeast. *Curr Protein Pept Sci* **11**: 680-692. Review.

- Perry JA, Kornbluth S.** (2007). Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell Div* **2**:12.
- Petersen J, Hagan IM.** (2005). Polo kinase links the stress pathway to cell cycle control and tip growth in fission yeast. *Nature* **435**: 507-512.
- Petersen J, Nurse P.** (2007). TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nat Cell Biol* **9**: 1263-1272.
- Petersen J.** (2009). TOR signalling regulates mitotic commitment through stress-activated MAPK and Polo kinase in response to nutrient stress. *Biochem Soc Trans* **37**: 273-277. Review.
- Phillips PC.** (2008). Epistasis--the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nat Rev Genet* **9**: 855-867.
- Pluskal T, Hayashi T, Saitoh S, Fujisawa A, Yanagida M.** (2011). Specific biomarkers for stochastic division patterns and starvation-induced quiescence under limited glucose levels in fission yeast. *FEBS J* **278**: 1299-1315.
- Pomerening JR, Kim SY, Ferrell JE Jr.** (2005). Systems-level dissection of the cell-cycle oscillator: bypassing positive feedback produces damped oscillations. *Cell* **122**: 565-578.
- Poyatos JF.** (2011). The balance of weak and strong interactions in genetic networks. *PLoS One* **6**: e14598.
- Qian YW, Erikson E, Taieb FE, Maller JL.** (2001). The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* **12**: 1791-1799.
- Rangone H, Wegel E, Gatt MK, Yeung E, Flowers A, Debski J, Dadlez M, Janssens V, Carpenter AT, Glover DM.** (2011). Suppression of scant identifies Endos as a substrate of greatwall kinase and a negative regulator of protein phosphatase 2A in mitosis. *PLoS Genet* **7**: e1002225.
- Reinders A, Bürckert N, Boller T, Wiemken A, De Virgilio C.** (1998). *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. *Genes Dev* **12**: 2943-2955.
- Rhind N, Russell P.** (1998). Mitotic DNA damage and replication checkpoints in yeast. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 749-758. Review.
- Roguev A, Bandyopadhyay S, Zofall M, Zhang K, Fischer T, Collins SR, Qu H, Shales M, Park HO, Hayles J, Hoe KL, Kim DU, Ideker T, Grewal SI, Weissman JS, Krogan NJ.** (2008). Conservation and rewiring of functional modules revealed by an epistasis map in fission yeast. *Science* **322**:405-410.
- Rowley R.** (1992). Radiation-induced mitotic delay: a genetic characterization in the fission yeast. *Radiat Res* **132**: 144-152. Review.
- Russell P, Nurse P.** (1986). Cdc25 functions as an inducer in the mitotic control of fission

## Bibliografía

yeast. *Cell* **45**: 145-153.

**Russell P, Nurse P.** (1987a). Negative regulation of mitosis by *wee1*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* **49**: 559-567.

**Russell P, Nurse P.** (1987b). The mitotic inducer *nim1+* functions in a regulatory network of protein kinase homologs controlling the initiation of mitosis. *Cell* **49**: 569-576.

**Russell P, Moreno S, Reed SI.** (1989). Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts. *Cell* **57**: 295-303.

**Russo AA, Jeffrey PD, Pavletich NP.** (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol* **3**: 696-700.

**Ryan CJ, Roguev A, Patrick K, Xu J, Jahari H, Tong Z, Beltrao P, Shales M, Qu H, Collins SR, Kliegman JI, et al.** (2012). Hierarchical modularity and the evolution of genetic interactomes across species. *Mol Cell* **46**: 691-704.

**Sabatinos SA, Forsburg SL.** (2009). Measuring DNA content by flow cytometry in fission yeast. *Methods Mol Biol* **521**: 449-461.

**Sadhu K, Reed SI, Richardson H, Russell P.** (1990). Human homolog of fission yeast *cdc25* mitotic inducer is predominantly expressed in G2. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5139-5143.

**Saito R, Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Lotia S, Pico AR, Bader GD, Ideker T.** (2012). A travel guide to Cytoscape plugins. *Nat Methods* **9**: 1069-1076.

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** (1989). Molecular cloning Vol. 2. Cold Spring Harbor N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Samejima I, Yanagida M.** (1994). Identification of *cut8+* and *cek1+*, a novel protein kinase gene, which complement a fission yeast mutation that blocks anaphase. *Mol Cell Biol* **14**: 6361-6371. Erratum in: *Mol Cell Biol* (1994) **14**: 7683.

**Sánchez-Díaz A, González I, Arellano M, Moreno S.** (1998). 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.

**Sanchez-Perez I, Renwick SJ, Crawley K, Karig I, Buck V, Meadows JC, Franco-Sanchez A, Fleig U, Toda T, Millar JB.** (2005). The DASH complex and *Klp5/Klp6* kinesin coordinate bipolar chromosome attachment in fission yeast. *EMBO J* **24**: 2931-2943.

**Sazer S, Sherwood SW.** (1990). Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast. *J Cell Sci* **97**: 509-516.

**Schuldiner M, Collins SR, Thompson NJ, Denic V, Bhamidipati A, Punna T, Ihmels J, Andrews B, Boone C, Greenblatt JF, Weissman JS, Krogan NJ.** (2005). Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* **123**: 507-519.

- Schuldiner M, Collins SR, Weissman JS, Krogan NJ.** (2006). Quantitative genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae* using epistatic miniarray profiles (E-MAPs) and its application to chromatin functions. *Methods* **40**: 344-352.
- Seaton BL, Yucel J, Sunnerhagen P, Subramani S.** (1992). Isolation and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* rad3 gene, involved in the DNA damage and DNA synthesis checkpoints. *Gene* **119**: 83-89.
- Shabb JB.** (2001). Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev* **101**: 2381-2411. Review.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T.** (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* **13**: 2498-2504.
- Shieh JC, Wilkinson MG, Millar JB.** (1998). The Win1 mitotic regulator is a component of the fission yeast stress-activated Sty1 MAPK pathway. *Mol Biol Cell* **9**: 311-322.
- Shiozaki K, Russell P.** (1995a). Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* **378**: 739-743.
- Shiozaki K, Russell P.** (1995b). Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *EMBO J* **14**: 492-502.
- Shiozaki K, Russell P.** (1996). Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev* **10**: 2276-2288.
- Simanis V, Nurse P.** (1986). The cell cycle control gene *cdc2+* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell* **45**: 261-268.
- Sipiczki M.** (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life?. *Genome Biol* **1**: reviews1011. Review.
- Skerker JM, Prasol MS, Perchuk BS, Biondi EG, Laub MT.** (2005). Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol* **3**: e334.
- Spirek M, Benko Z, Carnecka M, Rumpf C, Cipak L, Batova M, Marova I, Nam M, Kim DU, Park HO, et al.** (2010). *S. pombe* genome deletion project: an update. *Cell Cycle* **9**: 2399-2402.
- Stark C, Breitkreutz BJ, Reguly T, Boucher L, Breitkreutz A, Tyers M.** (2006). BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res* **34**: D535-539.
- Stern B, Nurse P.** (1996). A quantitative model for the *cdc2* control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet* **12**: 345-350. Review.
- Suda M, Yamada S, Toda T, Miyakawa T, Hirata D.** (2000). Regulation of Wee1 kinase

## Bibliografia

- in response to protein synthesis inhibition. *FEBS Lett* **486**: 305-309.
- Sugiura R, Kita A, Shimizu Y, Shuntoh H, Sio SO, Kuno T.** (2003). Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein. *Nature* **424**: 961-965.
- Sunnerhagen P.** (2002). Prospects for functional genomics in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* **42**: 73-84. Review.
- Sveiczzer A, Novak B, Mitchison JM.** (1999). Mitotic control in the absence of cdc25 mitotic inducer in fission yeast. *J Cell Sci* **112**: 1085-1092.
- Takeda T, Toda T, Kominami K, Kohnosu A, Yanagida M, Jones N.** (1995). *Schizosaccharomyces pombe* atf1+ encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *EMBO J* **14**: 6193-6208.
- Talarek N, Cameroni E, Jaquenoud M, Luo X, Bontron S, Lippman S, Devgan G, Snyder M, Broach JR, De Virgilio C.** (2010). Initiation of the TORC1-regulated G0 program requires Igo1/2, which license specific mRNAs to evade degradation via the 5'-3' mRNA decay pathway. *Mol Cell* **38**: 345-355.
- Tanaka K, Petersen J, MacIver F, Mulvihill DP, Glover DM, Hagan IM.** (2001). The role of Plo1 kinase in mitotic commitment and septation in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* **20**: 1259-1270.
- Tang Z, Shu H, Qi W, Mahmood NA, Mumby MC, Yu H.** (2006). PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Dev Cell* **10**: 575-585.
- Thuriaux P, Nurse P, Carter B.** (1978). Mutants altered in the control co-ordinating cell division with cell growth in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **161**: 215-220.
- Toda T, Dhut S, Superti-Furga G, Gotoh Y, Nishida E, Sugiura R, Kuno T.** (1996). The fission yeast pmk1+ gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the protein kinase C pathway. *Mol Cell Biol* **16**: 6752-6764.
- Tong AH, Evangelista M, Parsons AB, Xu H, Bader GD, Pagé N, Robinson M, Raghizadeh S, Hogue CW, Bussey H, et al.** (2001). Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* **294**: 2364-2368.
- Tyson JJ, Novak B.** (2011). Cell cycle: who turns the crank? *Curr Biol* **21**: 185-187.
- Ubersax JA, Woodbury EL, Quang PN, Paraz M, Blethrow JD, Shah K, Shokat KM, Morgan DO.** (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* **425**: 859-864.
- Uhlmann F, Bouchoux C, López-Avilés S.** (2011). A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: revisited. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**: 3572-3583. Review.
- Uritani M, Hidaka H, Hotta Y, Ueno M, Ushimaru T, Toda T.** (2006). Fission yeast Tor2

links nitrogen signals to cell proliferation and acts downstream of the Rheb GTPase. *Genes Cells* **11**: 1367-1379.

- Valbuena N, Moreno S.** (2010) TOR and PKA pathways synergize at the level of the Ste11 transcription factor to prevent mating and meiosis in fission yeast. *PLoS One* **5**: e11514.
- Valbuena N, Guan KL, Moreno S.** (2012). The Vam6 and Gtr1-Gtr2 pathway activates TORC1 in response to amino acids in fission yeast. *J Cell Sci* **125**: 1920-1928.
- van der Voet M, Lorson MA, Srinivasan DG, Bennett KL, van den Heuvel S.** (2009). *C. elegans* mitotic cyclins have distinct as well as overlapping functions in chromosome segregation. *Cell Cycle* **8**: 4091-4102.
- Vigneron S, Brioudes E, Burgess A, Labbé JC, Lorca T, Castro A.** (2009). Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A. *EMBO J* **28**: 2786-2793.
- Vigneron S, Gharbi-Ayachi A, Raymond AA, Burgess A, Labbé JC, Labesse G, Monsarrat B, Lorca T, Castro A.** (2011). Characterization of the mechanisms controlling Greatwall activity. *Mol Cell Biol* **31**: 2262-2275.
- Virshup DM, Shenolikar S.** (2009). From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* **133**: 537-545. Review.
- Visintin R, Craig K, Hwang ES, Prinz S, Tyers M, Amon A.** (1998). The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* **2**: 709-718.
- Voets E, Wolthuis RM.** (2010). MASTL is the human orthologue of Greatwall kinase that facilitates mitotic entry, anaphase and cytokinesis. *Cell Cycle* **9**: 3591-3601.
- Wagih O, Usaj M, Baryshnikova A, VanderSluis B, Kuzmin E, Costanzo M, Myers CL, Andrews BJ, Boone CM, Parts L.** (2013). SGAtools: One-stop analysis and visualization of array-based genetic interaction screens. *Nucleic Acids Res* **41**: W591-596.
- Walworth N, Davey S, Beach D.** (1993). Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature* **363**: 368-371.
- Wang J, Tadeo X, Hou H, Tu PG, Thompson J, Yates JR 3rd, Jia S.** (2013). Epe1 recruits BET family bromodomain protein Bdf2 to establish heterochromatin boundaries. *Genes Dev* **27**: 1886-1902.
- Wang P, Pinson X, Archambault V.** (2011). PP2A-twins is antagonized by greatwall and collaborates with polo for cell cycle progression and centrosome attachment to nuclei in *Drosophila* embryos. *PLoS Genet* **7**: e1002227.
- Wanke V, Pedruzzi I, Cameroni E, Dubouloz F, De Virgilio C.** (2005). Regulation of G0 entry by the Pho80-Pho85 cyclin-CDK complex. *EMBO J* **24**: 4271-4278.
- Weisman R, Choder M, Koltin Y.** (1997). Rapamycin specifically interferes with the developmental response of fission yeast to starvation. *J Bacteriol* **179**: 6325-6334.

## Bibliografia

- Weisman R, Finkelstein S, Choder M.** (2001). Rapamycin blocks sexual development in fission yeast through inhibition of the cellular function of an FKBP12 homolog. *J Biol Chem* **276**: 24736-24742.
- Weisman R, Roitburg I, Schonbrun M, Harari R, Kupiec M.** (2007). Opposite effects of tor1 and tor2 on nitrogen starvation responses in fission yeast. *Genetics* **175**:1153-1162.
- Williams DR, McIntosh JR.** (2002). *mcl1+*, the *Schizosaccharomyces pombe* homologue of CTF4, is important for chromosome replication, cohesion, and segregation. *Eukaryot Cell* **1**: 758-773.
- Wilson WA, Hawley SA, Hardie DG.** (1996). Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr Biol* **6**: 1426-1434.
- Wolf F, Sigl R, Geley S.** (2007). '... The end of the beginning': cdk1 thresholds and exit from mitosis. *Cell Cycle* **6**: 1408-1411.
- Wolfe BA, Gould KL.** (2004). Fission yeast Clp1p phosphatase affects G2/M transition and mitotic exit through Cdc25p inactivation. *EMBO J* **23**: 919-929.
- Wood PA, Du-Quiton J, You S, Hrushesky WJ.** (2006). Circadian clock coordinates cancer cell cycle progression, thymidylate synthase, and 5-fluorouracil therapeutic index. *Mol Cancer Ther.* **5**: 2023-2033. Erratum in: *Mol Cancer Ther* (2006) **5**: 3312.
- Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, et al.** (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**: 871-880.
- Wood V, Harris MA, McDowall MD, Rutherford K, Vaughan BW, Staines DM, Aslett M, Lock A, Bähler J, Kersey PJ, Oliver SG.** (2012). PomBase: a comprehensive online resource for fission yeast. *Nucleic Acids Res* **40**: D695-699.
- Wu JQ, Guo JY, Tang W, Yang CS, Freel CD, Chen C, Nairn AC, Kornbluth S.** (2009). PP1-mediated dephosphorylation of phosphoproteins at mitotic exit is controlled by inhibitor-1 and PP1 phosphorylation. *Nat Cell Biol* **11**: 644-651.
- Wu L, Russell P.** (1997). Nif1, a novel mitotic inhibitor in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* **16**: 1342-1350.
- Wurzenberger C, Gerlich DW.** (2011). Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 469-482.
- Yamaguchi S, Murakami H, Okayama H.** (1997). A WD repeat protein controls the cell cycle and differentiation by negatively regulating Cdc2/B-type cyclin complexes. *Mol Biol Cell* **8**: 2475-86.
- Yamaguchi S, Decottignies A, Nurse P.** (2003). Function of Cdc2p-dependent Bub1p phosphorylation and Bub1p kinase activity in the mitotic and meiotic spindle checkpoint. *EMBO J* **22**: 1075-1087.

- Yamawaki-Kataoka Y, Tamaoki T, Choe HR, Tanaka H, Kataoka T.** (1989). Adenylate cyclases in yeast: a comparison of the genes from *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5693-5697.
- Yang H, Jiang W, Gentry M, Hallberg RL.** (2000). Loss of a protein phosphatase 2A regulatory subunit (Cdc55p) elicits improper regulation of Swe1p degradation. *Mol Cell Biol* **20**: 8143-8156.
- Ye Y, Lee IJ, Runge KW, Wu JQ.** (2012). Roles of putative Rho-GEF Gef2 in division-site positioning and contractile-ring function in fission yeast cytokinesis. *Mol Biol Cell* **23**:1181-1195.
- Yellman CM, Burke DJ.** (2006). The role of Cdc55 in the spindle checkpoint is through regulation of mitotic exit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **17**: 658-666.
- Yu EY, Lee JH, Kang WH, Park YH, Kim L, Park HM.** (2013). Fission yeast LAMMER kinase Lkh1 regulates the cell cycle by phosphorylating the CDK-inhibitor Rum1. *Biochem Biophys Res Commun* **432**: 80-85.
- Yu J, Fleming SL, Williams B, Williams EV, Li Z, Somma P, Rieder CL, Goldberg ML.** (2004). Greatwall kinase: a nuclear protein required for proper chromosome condensation and mitotic progression in *Drosophila*. *J Cell Biol* **164**: 487-492.
- Yu J, Zhao Y, Li Z, Galas S, Goldberg ML.** (2006). Greatwall kinase participates in the Cdc2 autoregulatory loop in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* **22**: 83-91.
- Zeng Y, Forbes KC, Wu Z, Moreno S, Piwnicka-Worms H, Enoch T.** (1998). Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature* **395**: 507-510.
- Zhao Y, Haccard O, Wang R, Yu J, Kuang J, Jesus C, Goldberg ML.** (2008). Roles of Greatwall kinase in the regulation of cdc25 phosphatase. *Mol Biol Cell* **19**:1317-1327.
- Zimmermann C, Chymkowitch P, Eldholm V, Putnam CD, Lindvall JM, Omerzu M, Bjørås M, Kolodner RD, Enserink JM.** (2011). A chemical-genetic screen to unravel the genetic network of CDC28/CDK1 links ubiquitin and Rad6-Bre1 to cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 18748-18753.
- Zuin A, Carmona M, Morales-Ivorra I, Gabrielli N, Vivancos AP, Ayté J, Hidalgo E.** (2010). Lifespan extension by calorie restriction relies on the Sty1 MAP kinase stress pathway. *EMBO J* **29**: 981-991.

## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGC	Familia de las proteína quinasas A, G y C
APC	Anaphase-promoting complex
ARG	<i>Averaged relative growth</i>
ARN	Ácido ribonucleico
as	<i>Analogue-sensitive</i>
ATP	Adenosín trifosfato
BiNGO	<i>Biological networks gene ontology tools</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CAK	<i>CDK-activating kinase</i>
CaMK	<i>Calcium/calmodulin kinase</i>
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CDC	<i>Cell division cycle</i> (ciclo de división celular)
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CESR	<i>Core environmental stress response</i>
CKI	<i>Cycling dependent kinase inhibitor</i>
CLS	<i>Chronological lifespan</i>
CMD	Crecimiento del mutante doble
CMS	Crecimiento del mutante sencillo
CV	Coefficiente de varianza
D.O	Densidad óptica
DAPI	4,6-Diamidinio-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
E-MAP	Epistatic miniarray profiles
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EMM	<i>Edinburgh minimal medium</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GO	<i>Gene ontology</i>
Kb	Kilobases

## Abreviaturas

MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEA	<i>Malt extract agar</i>
MM	Medio minimo
ORF	<i>Open reading frame</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polietilenglicol
Plnt	<i>Pombe interactome</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i> (proteína quinasa A)
PP2A	<i>Protein phosphatase 2A</i>
ppp	Punto por pulgada
RF	<i>Random forest</i>
RG	<i>Relative growth</i>
RNAi	Ácido ribonucleico interferente
RSA	<i>Random spore analysis</i>
SAC	<i>Spindell assembly checkpoint</i>
SCF	<i>Skp, Cullin, F-box complex</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SGA	<i>Synthetic genetic array</i>
SPB	<i>Spindle pole body</i>
SRP	<i>Stress response pathway</i>
SVM	<i>Supported vector machine</i>
TOR	Target of rapamycin
TORC	Complejo TOR 1
ts	Termosensibles
YEP	<i>Yeast extract with supplements and Phloxine B</i>
YES	<i>Yeast extract with supplements</i>