

Caracterización cuantitativa de las ciclinas de la fase G1 del ciclo celular en *Saccharomyces cerevisiae*.

Elisabet Bállega Moreno

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

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

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



**Caracterización cuantitativa de las ciclinas de la fase G1 del ciclo celular en
*Saccharomyces cerevisiae***

Elisabet Bállega Moreno

Barcelona, 2017

Memoria presentada para optar al título de doctor por la Universitat
Internacional de Catalunya

Trabajo dirigido por el Dr. Josep Clotet Erra del área de Ciencias Básicas de la
Universitat Internacional de Catalunya

A mis padres,

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Ciclo celular en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1.2 Reguladores del ciclo celular	4
1.2.1 Proteína quinasa dependiente de ciclina Cdc28	5
1.2.2 Ciclinas de Cdc28	5
1.2.3 Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina Sic1	7
1.2.4 Proteína quinasa dependiente de ciclina Pho85	7
1.2.5 Ciclinas de Pho85.....	7
1.2.6 Dinámica del ciclo celular	9
1.2.7 Factores que alteran la dinámica del ciclo celular en <i>S. cerevisiae</i>	12
1.3 Cuantificación de las ciclinas	13
2. HIPÓTESIS.....	18
3. OBJETIVOS.....	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4.1 Cepas	26
4.2 Secuencia 3HA modificada	27
4.3 Plásmido pGEX6p1- <i>URA-kanMX4-3HA</i>	28

4.4	Condiciones de crecimiento	29
4.5	Selección de transformantes en medio 5-FOA	29
4.6	Experimentos de sincronización	30
4.7	Citometría de flujo	30
4.8	Índice de gemación	30
4.9	Extractos celulares e análisis por inmunoblot	31
4.10	Ensayos de viabilidad	31
4.11	Cálculo del tiempo de duplicación	31
4.12	Determinación del punto de cruce entre Clb5 y Sic1	32
4.13	Análisis cuantitativo	32
4.14	Análisis estadístico	33
4.15	Sistema de trabajo utilizado	33
5.	RESULTADOS.....	39
5.1	Estrategia de marcaje	39
5.2	El 3'UTR regula la expresión de Pcl1	42
5.3	La etiqueta 3HA respeta la expresión de Pcl1	44
5.4	Las ciclinas marcadas respetando el 3'UTR se comportan igual.	45
5.5	Pcl's y Cln's presentan la misma cantidad en condiciones normales de laboratorio	46

5.6 La cantidad de Pcl's aumenta en YPD a 37°C	48
5.7 La cantidad de Pcl's aumenta cuando se da un <i>heat shock</i> a 37°C.....	50
5.8 En medio mínimo completo las ciclinas de G1 presentan un patrón de expresión normal.....	52
5.9 En respuesta a nutrientes hay un aumento de Pcl's	54
5.10 En medio de cultivo compuesto por malta las ciclinas de G1 presentan un patrón de expresión normal	56
5.11 La cantidad de Pcl's aumenta drásticamente a 37°C en medio compuesto por malta	58
5.12 La cantidad de Pcl's aumenta en medio compuesto por malta con <i>heat shock</i> a 37°C	60
5.14 En estrés oxidativo aumenta la cantidad de Pcl's	64
5.15 Las Cln's aumentan ligeramente bajo estrés reductivo	66
5.16 Representación gráfica general de las condiciones de estudio	68
5.17 Estudio de <i>pcl2Δ</i> en situación de estrés térmico	69
5.17.1 La ausencia de Pcl2 en YPD a 30°C no afecta a la progresión del ciclo celular	69
5.17.2 El índice de gemación se reduce en <i>pcl2Δ</i> en YPD a 37°C.....	70

5.17.3 En ausencia de Pcl2 la progresión del ciclo celular se ve retrasada en medio compuesto por malta con <i>heat shock</i> a 37°C	72
5.17.4 <i>pcl2Δ</i> no crece a 37°C en un fondo W303-1A	73
5.18 La colección de ciclinas, una herramienta versátil	76
6. DISCUSIÓN.....	81
7. CONCLUSIONES.....	94
9. ABSTRACT.....	102
8. REFERENCIAS.....	106
9. ANEXOS.....	121
9.1 Imágenes representativas de western blot.....	121
9.2 Comparación de las ciclinas bajo todas las condiciones de estudio.....	125

1. INTRODUCCIÓN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es conocida y utilizada por la humanidad desde los años 6000 a.C. Se trata de un organismo eucariota unicelular perteneciente al reino de los hongos. Crece preferentemente sobre frutas, flores y otros sustratos ricos en azúcar, que usan como fuente de carbono, característica ya conocida en Mesopotamia, en el antiguo Egipto o en Georgia donde la levadura, al igual que hoy en día, era utilizada para producir cerveza, pan o vino (Capece et al. 2013; Legras et al. 2014).

A parte del interés de esta levadura a nivel industrial, ya sea en la alimentación como en la industria vitivinícola o cervecera, también presenta un gran interés en otros ámbitos tan importantes como la bioremediación, la obtención de productos de alto valor añadido como el bioetanol, la obtención de moléculas de interés farmacéutico como la insulina, antígenos de superficie de virus de la gripe o la hepatitis B y enzimas o proteínas sanguíneas humanas tales como la albúmina o factores de coagulación. También juega un papel importante en la investigación de procesos biológicos y en la investigación biomédica, en enfermedades tan prevalentes como el cáncer. Esto es así debido a que como modelo eucariota resulta idóneo gracias a su facilidad de manipulación en el laboratorio, a que su genoma se encuentra totalmente secuenciado (Dujon, 1996; Goffeau et al., 1996) y a que gran parte de sus genes se conservan en humanos, estando muchos de ellos implicados en la regulación del ciclo celular (Harashima et al. 2013).

1.1 Ciclo celular en *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae presenta dos estrategias de reproducción: la sexual y la asexual. En la primera dos células haploides de distinto sexo (α y a) se conjugan para dar lugar a un diploide y la segunda, la reproducción asexual, se lleva a cabo por gemación de células haploides y se da de una forma asimétrica, donde a partir de una célula madre que produce una pequeña

protuberancia o gema que recibe el material genético duplicado, se separa dando lugar a la célula hija.

La reproducción preferente de la levadura es la asexual, pero cuando los nutrientes escasean, se reproduce sexualmente por conjugación de células de sexo contrario, α y a (Shimoda 2003). Resultante de esta conjugación se obtiene un heterocarion diploide que no podrá reproducirse de forma sexual, pero sí asexualmente por gemación. En ausencia de nutrientes, se inducirá la meiosis que dará lugar a la esporulación y que finalmente culminará con la liberación de 4 esporas haploides, capaces de reiniciar todo el ciclo de duplicación de nuevo.

Los procesos pertinentes al ciclo celular están altamente conservados en eucariotas e incluyen una serie de procesos en los cuales la célula crece, duplica su material genético, el *spindle pole body* (SPB, centro organizador de los microtúbulos) y se divide. El ciclo celular sólo se iniciará cuando la célula madre alcance un tamaño determinado, esta sea estimulada por señales tanto exógenas como endógenas y se pueda garantizar la correcta duplicación del material genético. Todos estos procesos están distribuidos en 4 fases bien diferenciadas: en la fase S (síntesis) se da el crecimiento de la gema, la duplicación del material genético y del SPB; en la fase M (mitosis) se segrega el material genético; mientras que en las dos fases restantes, G1 y G2 (*gaps*), situadas entre S y M, la célula crece y prepara todos los mecanismos necesarios para llevar a cabo la siguiente fase. En el caso que las condiciones celulares o ambientales no fueran las adecuadas, la célula entrará en un estado de quiescencia o fase G₀, donde la levadura reduce su tamaño, induce tolerancia a estrés y para todos los mecanismos de replicación hasta que las condiciones sean favorables (Crosby 2007; De Virgilio 2012; Miles et al. 2016).

Durante todo este proceso existen eventos de control (o *checkpoints*) en los que se monitoriza si el tamaño de la célula es adecuado para dividirse, si la disponibilidad de nutrientes es suficiente y si el material genético está correcto. El *checkpoint* de mayor importancia, ya que decidirá si la célula progresará por el ciclo o no, está situado al final de la fase G1 y se denomina

Start (Johnston et al. 1977). Una vez llegado a este punto, si la célula ha alcanzado el tamaño necesario y dispone de suficientes nutrientes, avanzará hacia la fase S, alcanzando un punto de no retorno en el que la célula se ve obligada a replicar su DNA y progresar a través del ciclo (Dungrawala et al. 2012) (

Figura 1). Existen otros *checkpoints* adicionales que detienen el ciclo si la morfología celular no es correcta, para evitar daño al DNA o muerte celular y se encuentran situados en la transición G1-S y G₂-M.

Una vez superados todos los *checkpoints*, la célula entra en mitosis, donde se observa que el DNA se condensa durante la profase, se alinea con el huso mitótico en metafase, se separa en dos en anafase y se vuelve a condensar en telofase. En *S. cerevisiae*, a diferencia de otros eucariotas, la mitosis se caracteriza por ser cerrada, ya que la membrana nuclear no desaparece. Este proceso concluye con la citoquinesis en la que los 16 cromosomas duplicados de la levadura son repartidos entre célula madre e hija.

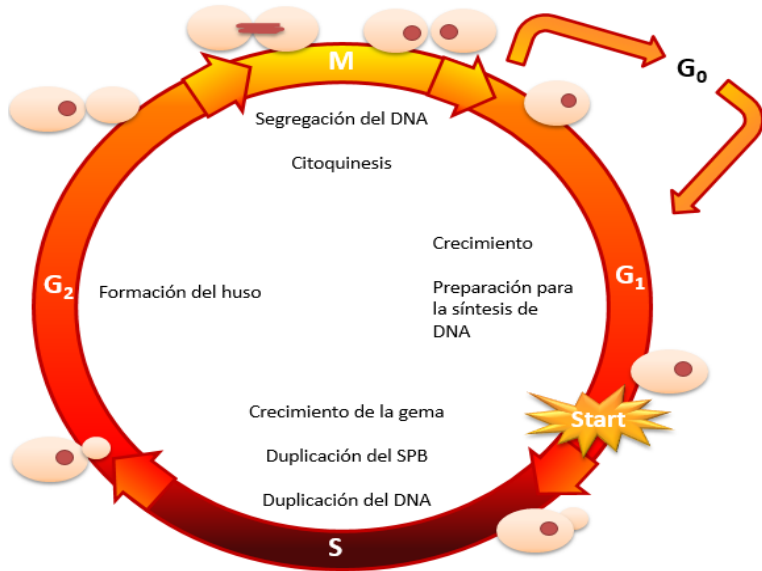


Figura 1. Ciclo celular de *S. cerevisiae*. Se representa la evolución de la morfología en las diferentes etapas del ciclo, así como los principales eventos asociados a su progresión.

1.2 Reguladores del ciclo celular

Los principales reguladores del ciclo celular son las quinasas dependientes de ciclinas o CDK's (del inglés *Cyclin Dependent Kinases*) que actúan conjuntamente con sus activadores llamados ciclinas e inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas o CKI's (del inglés *Cyclin dependent Kinase Inhibitor*) (Morgan 1997; Golias et al. 2004).

Una CDK es una enzima cuya función es transferir grupos fosfato a partir de moléculas donantes de alta energía, tales como el ATP, a sustratos específicos en un proceso denominado fosforilación. Las CDK's presentan funciones conservadas en eucariotas superiores. De hecho, las levaduras

pueden proliferar normalmente cuando una CDK es sustituida por su homóloga humana (Measday et al. 1997).

Existen 6 CDK's en *S. cerevisiae*: Kin28, Srb10, Bur1 y Ctk1, cuya función principal es fosforilar la región C-terminal de la RNA polimerasa III y Cdc28 y Pho85, cuya función principal es la de regulación del ciclo celular (Liu & Kipreos 2000; Malumbres 2014). La activación de Cdc28 y Pho85 depende de una gran familia de ciclinas, mientras que la activación de las otras CDK's depende exclusivamente de una única ciclina (Measday et al., 1997; Roberts, 1999; Murray et al., 2004). Las ciclinas son expresadas periódicamente y cada una actúa en puntos concretos del ciclo celular, a excepción de Cln3 que se encuentra a lo largo de todo el ciclo, y todas ellas son reguladas por procesos de síntesis y proteólisis (Lodish et al. 2000; Bouchoux & Uhlmann, 2011). La unión CDK-ciclina se da gracias a un dominio conservado que presentan las ciclinas y que se conoce como caja de ciclina (*cyclin box*), región necesaria para la activación de la CDK (Miller et al. 2005). Por otro lado, encontramos otro tipo de regulación a través de inhibición, como la llevada a cabo por la CKI Sic1 en G1, bloqueando el paso a fase S hasta que no se haya completado la primera fase.

1.2.1 Proteína quinasa dependiente de ciclina Cdc28

La CDK Cdc28, o Cdk1 en mamíferos, es la principal reguladora del ciclo celular en *S. cerevisiae*. Se trata de una proteína esencial y sus mutantes condicionales bloquean el ciclo (Hartwell et al. 1973; Li & Cai 1997).

1.2.2 Ciclinas de Cdc28

Las ciclinas de Cdc28 se dividen en 2 grupos: las ciclinas de G1 conocidas como Cln1, Cln2 y Cln3, regulan eventos entre la citoquinesis y la replicación del DNA, y las ciclinas de tipo B, Clb1, Clb2, Clb3, Clb4 Clb5 y Clb6

son necesarias para la replicación, la progresión por fase G₂ y el paso por mitosis (Figura 2).

Cln1 y Cln2 comparten un 57% de homología y se unen a Cdc28, activándolo en *Start* (Quilis & Igual 2012). Las deleciones individuales de estos genes no tienen grandes efectos en el ciclo celular, pero el doble mutante *cln1Δcln2Δ* crece más lento, presenta morfología aberrante y retrasa el comienzo de la síntesis de DNA debido a que la CKI de fase S, Sic1, no se degrada a tiempo (Moffat & Andrews 2004). En condiciones normales los complejos Cdc28-Cln1/2 fosforilan a Sic1, marcándolo para su destrucción (Barberis et al. 2005).

Cln3 solamente comparte un 25% de homología con Cln1 y Cln2 y es una ciclina muy poco abundante y su transcripción se mantiene constante a lo largo del ciclo celular (Tyers et al. 1993; McInerney et al. 1997). La regulación de la actividad del complejo Cdc28-Cln3 se lleva a cabo mediante mecanismos post-traduccionales (Tyers, Tokiwa, & Futcher, 1993, Gallego, Garí, Colomina, Herrero, & Aldea, 1997). Esta ciclina es importante ya que es la desencadenadora del ciclo celular, mediante la activación del factor de transcripción SBF. Esta activación se da gracias a la fosforilación por parte del complejo Cdc28-Cln3 y Pho85-Pcl9 de Whi5, que se encuentra inhibiendo al factor de transcripción SBF y que cuando es fosforilado es exportado hacia el citoplasma, liberando a SBF y permitiendo la transcripción de las ciclinas de G1 (de Bruin et al. 2004).

Por otro lado, las ciclinas de tipo B Clb5 y Clb6 se producen en G1 por la activación del factor de transcripción MBF, pero son inhibidas por Sic1 hasta el final de G1, ya que son las encargadas de iniciar la fase S y de bloquear los complejos Cdc28-Cln para que el ciclo no pueda volver atrás (Jackson et al. 2006). Clb3 y Clb4 aparecen al final de S y puede que jueguen un papel en la replicación del DNA, la formación del huso y la transición G₂-M (Richardson et al. 1992). Clb1 y Clb2 promueven el crecimiento de la gema, la separación de cromosomas e inhiben eventos específicos de G1 (Küntzel et al. 1996; Broach et al. 1997).

1.2.3 Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina Sic1

Sic1 regula el comienzo de la fase S mediante un doble mecanismo: primero por la inhibición de los complejos Cdc28-Clb5/6 durante la fase G1 y segundo, por el transporte de Clb5 y Clb6 al núcleo (Rossi et al. 2005; Barberis 2012). A principios de fase G1 los niveles de Sic1 son máximos y disminuyen de golpe después de que el complejo Cdc28-Cln fosforile a Sic1 y cuando este está fosforilado en al menos 6 de sus 9 sitios de fosforilación, queda marcado para su degradación vía proteasoma, lo que dará lugar a la entrada de la fase S (Deshaies & Ferrell 2001; Nash et al. 2001; Kõivomägi et al. 2011).

1.2.4 Proteína quinasa dependiente de ciclina Pho85

Pho85 es una CDK con implicaciones en procesos de regulación tan diversos como la polaridad de la célula, el citoesqueleto de actina, el metabolismo del fosfato y del glucógeno, la señalización de cambios en el ambiente y por supuesto, la regulación de la progresión del ciclo celular por G1 (Carroll & O'Shea 2002). El homólogo en mamíferos de Pho85 podría ser Cdk5 o Cdk16, y se ha visto que Cdk5 de ratón puede revertir en gran parte el fenotipo observado en células *pho85Δ*, además de que coimmunoprecipita con las ciclinas de Pho85 (Huang et al. 1999; Nishizawa et al. 1999).

1.2.5 Ciclinas de Pho85

Las ciclinas de Pho85 también presentan dos grupos de acuerdo a la similitud de sus secuencias en la región correspondiente a la caja de ciclina. La familia Pcl1,2 está constituida por Pcl1, Pcl2 Pcl5, Pcl9 y Clg1 y la familia Pho80 la forman Pho80, Pcl6, Pcl7, Pcl8 y Pcl10 (Figura 2).

Dentro de estas dos familias se pueden hacer distinciones entre las funciones que realizan cada una de las ciclinas que las componen. Por ejemplo, la familia Pho80 regula la respuesta a nutrientes y condiciones ambientales, juntamente con Pcl5 de la familia Pcl1,2 que regula la respuesta

a la privación de aminoácidos (Bömeke et al. 2006) . El resto de ciclinas de la familia Pcl1,2 presentan funciones concretas en la regulación de la progresión del ciclo, a excepción de Pcl7 que está regulada cíclicamente, presentando un pico de expresión en fase S, aunque regula el metabolismo del glucógeno (Lee et al. 2000; Wang et al. 2001).

Las ciclinas Pcl1, Pcl2 y Pcl9 son consideradas de G1 ya que su expresión se da en esta fase. Pcl9 se expresan entre el final de la fase M y principio de G1, mientras que Pcl1 y Pcl2 son expresadas al final de G1, siguiendo el mismo patrón de expresión que Cln1 y Cln2, además de ser activadas por los mismo factor de transcripción, SBF (Measday et al. 1997). Tanto Pcl1 como Pcl2 resultan esenciales en ausencia de Cln1 y Cln2 en *Start* (Espinoza et al. 1994; Measday et al. 2000). Pcl7 presenta su máxima expresión en fase S (Lee et al. 2000).

Clg1 muestra una secuencia similar a Pcl1 y Pcl2 (Matsumoto & Wickner, 1993) y estudios anteriores sugieren que juega un papel en G1 marcando a Sic1 para su degradación y ejerciendo un efecto regulador positivo en la inducción de autofagia (Yang et al. 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, la ausencia de la CDK Cdc28 es letal, pero en el caso de la delección de Pho85 la célula sigue siendo viable aunque su morfología se ve afectada y la duración del ciclo celular aumenta. Del mismo modo, la ausencia simultánea de las 4 ciclinas de G1 (Pcl1, Pcl2, Cln1 y Cln2) es letal, pero no lo es la ausencia de únicamente 3 de ellas (Fernandez-Sarabia et al. 1992; Measday et al. 1994; Moffat & Andrews, 2004), sugiriendo que existen funciones redundantes entre ellas y que el complejo Pho85-Pcl puede suplir las funciones esenciales de Cdc28-Cln.

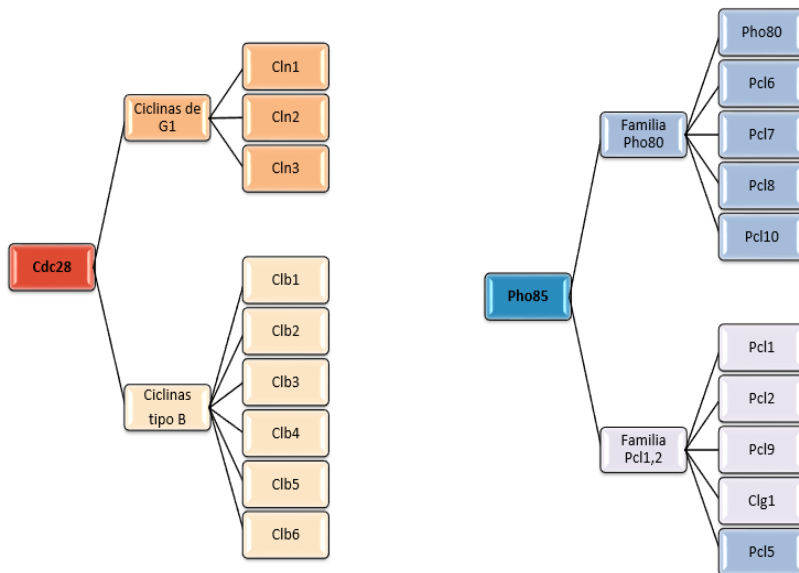


Figura 2. CDK's implicadas en la progresión del ciclo celular en *S. cerevisiae*. Cdc28 presenta dos grupos diferenciados de ciclinas, el primer grupo de ciclinas actúan en la fase G1, a excepción de Cln3 que es una ciclina constitutiva, y el segundo grupo de ciclinas, las de tipo B, actúan en el resto de fases. Pho85 también presenta dos familias pero únicamente la de Pcl1,2 está implicada en la progresión del ciclo, a excepción de Pcl5 que regula la respuesta a la privación de aminoácidos. La segunda familia de ciclinas, la de Pho80, controla la respuesta a niveles de nutrientes y condiciones ambientales.

1.2.6 Dinámica del ciclo celular

El control del ciclo celular es llevado a cabo por la activación de los complejos formados por las CDK's Cdc28 y Pho85 y sus correspondientes ciclinas en momentos concretos del ciclo, los cuales producen ondas de aparición y desaparición de dichas ciclinas a lo largo del ciclo celular, mediante mecanismos bien regulados de síntesis y degradación de las mismas (Simon et

al., 2001; Breeden, 2003; Bähler 2005). Las ondas de máxima transcripción de ciclinas se producen en las transiciones G₁-S, G₂-M y M-G₁ (Bertoli et al. 2013). La implicación durante el ciclo celular de ambas CDK's difiere en que Cdc28 presenta funciones a lo largo de todo el ciclo mientras que a Pho85 la encontramos únicamente en G₁, aunque también podría presentar alguna función en S, ya que es en esta fase en la que se ha descrito mayor cantidad del transcrito de Pcl7 (Measday et al. 1997; Lee et al. 2000).

El inicio del ciclo se da cuando los complejos Cdc28-Cln3 y Pho85-Pcl9 fosforilan a Whi5 que se encuentra bloqueando al factor de transcripción SBF (Huang et al. 2009; Bertoli et al. 2013). Esta fosforilación permite la disociación de Whi5 de SBF, migrando hacia el citoplasma y dando lugar a la transcripción de las primeras ondas de ciclinas de G₁-S: Cln1, Cln2, Pcl1 y Pcl2 (Simon et al. 2001), que a su vez aumentan aún más la fosforilación de Whi5 y por lo tanto su inhibición en un mecanismo de retroalimentación positiva (de Bruin et al. 2004; Costanzo et al., 2004; Wittenberg & Reed 2005). El complejo Cdc28/Cln3 también regula para llevar a cabo el inicio del ciclo, a la proteína Stb1, que se ha encontrado regulando a SBF y MBF y a la proteína deacetilasa Rpd3 (Wang et al. 2009). Por otro lado, también se transcriben las ciclinas de fase S, Clb5 y Clb6, gracias a la activación del factor de transcripción MBF, aunque quedan inhibidas hasta el inicio de fase S por la CKI Sic1. De este modo, a medida que progresa la fase G₁, Sic1 va siendo fosforilado tanto por los complejos Cdc28-Cln como Pho85-Pcl, hasta un límite en el que de golpe se produce su degradación (Nishizawa et al. 1998; Wysocki et al. 2006), mecanismo que da paso a la siguiente onda de actividad de ciclinas, Clb5 y Clb6, correspondientes a la fase S y responsables de iniciar los procesos de replicación del material genético (Mendenhall & Hodge 1998; Jackson et al. 2006). Una vez producidas las ciclinas de fase S, MBF queda inhibido por el correpresor Nrm1, lo que frenará la transcripción de Clb5 y Clb6 (Bertoli et al. 2013). A mitad de fase S aparece la tercera onda de ciclinas, correspondientes a Clb3,4, que juegan un papel importante en la transición G₂-M y podrían estar involucradas en la replicación del DNA y en la formación del huso (Richardson et al. 1992; Bloom & Cross 2007). La última onda de ciclinas

aparece justo antes de anafase y se da por dos ciclinas altamente homólogas, Clb1 y Clb2, que promueven el crecimiento de la gema, la segregación cromosómica e inhiben eventos específicos de G1 (Bloom & Cross 2007).

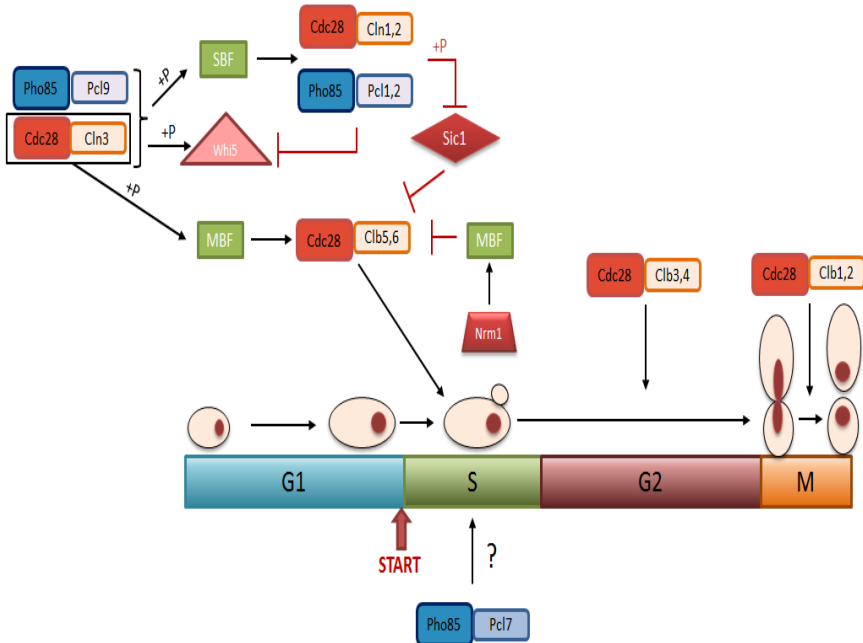


Figura 3. Especificidad de las ciclinas en el control del ciclo celular. Las ciclinas de G1 son activadas por SBF gracias a la fosforilación de Whi5 por Cdc28-Cln3 y Pho85-Pcl9. Promueven el crecimiento de la gema y la activación de las ciclinas B mediante la fosforilación de la CKI Sic1 que queda marcada para su degradación. Las ciclinas de fase S, activan la replicación del DNA y promueven la correpresión por parte de Nrm1 de MBF. Las ciclinas de fase M promueven la formación del huso y el inicio de esta fase, inhibiendo la salida de esta fase y promoviendo la citocinesis. Finalmente se separa la célula hija de la madre y el ciclo vuelve a empezar.

1.2.7 Factores que alteran la dinámica del ciclo celular en *S. cerevisiae*

S. cerevisiae depende exclusivamente de las condiciones del medio en el cual crece. Este microorganismo usa diversos glúcidos como fuente de carbono (glucosa, maltosa, sacarosa o fructosa). También puede usar fuentes de carbono no fermentables, como acetato, etanol o glicerol. Al tratarse de un anaerobio facultativo, en abundancia de azúcares llevará a cabo la fermentación alcohólica, donde mediante la glucólisis producirá etanol, CO₂ y ATP y en escasez de azúcares pasará a la respiración del etanol, vía ciclo de Krebs. A parte, también necesita otros nutrientes tales como aminoácidos, vitaminas, urea, iones como calcio, sodio, amonio o potasio. La principal fuente de fosfato la obtienen del fosfato inorgánico. También metabolizan azufre a partir de sulfatos. Como elementos traza, encontramos metales de transición como el hierro, el cobre, el zinc y el manganeso.

En el trabajo de laboratorio en el que la levadura es utilizada como organismo modelo, a menudo se olvida que en su ambiente natural, la levadura está expuesta a una gran variabilidad respecto a la cantidad de nutrientes, temperatura, pH, radiación, presencia de agentes tóxicos, disponibilidad de oxígeno y agua. Cualquier variación de las condiciones normales de laboratorio se suele definir como situación de estrés y esto desencadena una serie de respuestas celulares para proteger a la célula y mantener la homeostasis o por el contrario, si el estrés es extremo desencadenará en la muerte celular.

La bioquímica correspondiente a las rutas metabólicas se encuentra conservada desde bacterias a humanos, aunque el control de cada mecanismo se encuentra adaptado a la necesidad de cada tipo celular (Otterstedt et al. 2004). Del mismo modo, la respuesta a estrés está conservada evolutivamente en todos los organismos vivos e incluye una serie de procesos transcripcionales, traduccionales y post-traduccionales, denominados respuesta a estrés ambiental (o ESR, del inglés *Environmental Stress Response*) (Brion et al. 2016). Esta respuesta funciona gracias a un conjunto de genes que se activan ante esta situación y sintetizan los productos necesarios para

hacerle frente. Estos genes se caracterizan por poseer uno o más elementos de respuesta a estrés (STRE) en su promotor, la función de los cuales es la coordinación de la síntesis de proteínas y enzimas específicas de respuesta a una situación de estrés y que son activados por factores de transcripción como Msn2, Msn4 y Hsm1 (Gasch et al., 2000; Causton et al., 2001; Rodrigues-Pousada et al., 2004).

En cuanto al ciclo celular, ante una situación de estrés, la levadura suele bloquear la progresión del ciclo celular hasta que la situación queda solucionada, produciendo un retraso en la evolución del ciclo celular (Escoté et al. 2004; Clotet & Posas 2007; Brauer et al. 2008; Jiménez et al. 2015).

1.3 Cuantificación de las ciclinas

Hasta el momento, lo único que se conoce del carácter oscilatorio de las ciclinas de la levadura es el momento en el cual presentan su máxima expresión, información que se obtiene a partir de diferentes estudios realizados por diferentes laboratorios y bajo diferentes condiciones. Todos estos estudios aportan información cualitativa y se presenta a las ciclinas como ondas con la misma amplitud (Figura 4), lo que lleva a una percepción errónea donde todas las ciclinas se encuentran presentes en la misma cantidad. Además, todo este conocimiento es incompleto ya que el comportamiento de las ciclinas de Pho85 nunca se ha estudiado.

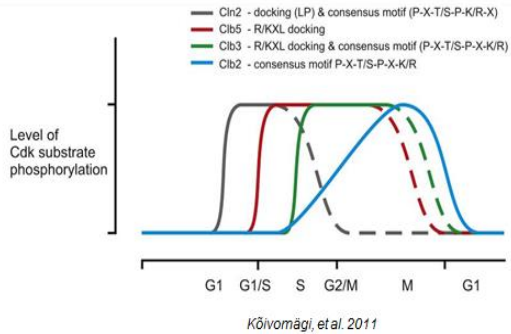
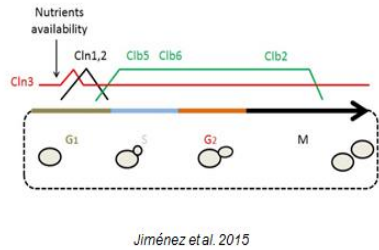
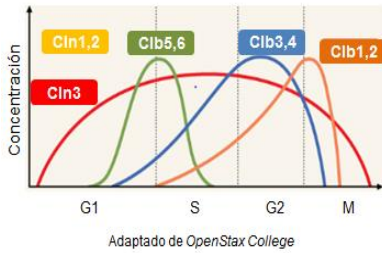


Figura 4. Ondas de ciclinas a lo largo del ciclo. Representación del momento de expresión de las ciclinas de Cdc28 a lo largo del ciclo celular en diferentes estudios.

HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta que existen dos CDK's que regulan la progresión del ciclo celular, cabe la posibilidad de que cada una de ellas junto con sus ciclinas presenten funciones diferenciales ante determinadas situaciones de estrés y que en esas situaciones concretas la CDK Pho85, considerada una CDK redundante, presente mayor implicación que Cdc28. Por lo tanto, la hipótesis que se plantea en esta tesis es la siguiente: el complejo Pho85/Pcl juega un papel necesario en determinadas condiciones de estrés.

3. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es la caracterización, a nivel cuantitativo, del comportamiento de las ciclinas tanto de Cdc28 como de Pho85 en G1.

Este objetivo queda dividido en los siguientes objetivos parciales:

1. Determinación de la estrategia de marcaje de las ciclinas que menos altere a la célula.
2. Generación de una colección de levaduras con todas las ciclinas de G1 marcadas mediante la misma etiqueta y siguiendo las indicaciones del objetivo 1.
3. Obtención de patrones de expresión de las ciclinas de G1 en condiciones normales.
4. Obtención de patrones de expresión de las ciclinas de G1 bajo diferentes condiciones de estrés.
5. Caracterización inicial de aquellas condiciones ambientales en las que las ciclinas del complejo Pho85 tengan una función más relevante.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cepas

Código	Fondo	Genotipo	Fuente
BY4741	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leuΔ200 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
YNR008	W303-1A	<i>MATa ura3-52 trp1Δ2 leu2-3 112his3-11 ade2-1 can1-100</i>	Euroscarf
YEB27	W303	<i>PCL1-3HA</i>	Este estudio
YEB56	W303	<i>PCL1-3HA-Kan</i>	Este estudio
YEB88	BY4741	<i>CLB5-3HA</i>	Este estudio
YEB53	BY4741	<i>CLB5-3HA-Kan</i>	Este estudio
YEB112	BY4741	<i>PCL1-3HA</i>	Este estudio
YEB113	BY4741	<i>PCL2-3HA</i>	Este estudio
YEB114	BY4741	<i>PCL7-3HA</i>	Este estudio
YEB115	BY4741	<i>PCL9-3HA</i>	Este estudio
YEB116	BY4741	<i>CLN1-3HA</i>	Este estudio
YEB117	BY4741	<i>CLN2-3HA</i>	Este estudio
YEB118	BY4741	<i>CLN3-3HA</i>	Este estudio
YEB119	BY4741	<i>CLB5-3HA</i>	Este estudio
YEB120	BY4741	<i>SIC1-3HA</i>	Este estudio
YEB26	BY4741	<i>pcl1Δ::URA-hyg</i>	Este estudio
YEB93	BY4741	<i>pcl2Δ::URA-kanMX4-3HA</i>	Este estudio
YEB31	BY4741	<i>pcl7Δ::URA-kanMX4-3HA</i>	Este estudio
YEB61	BY4741	<i>pcl9Δ::URA-kanMX4-3HA</i>	Este estudio
YEB96	BY4741	<i>cln1Δ::URA-kanMX4-3HA</i>	Este estudio
YEB175	BY4741	<i>cln2Δ::URA-kanMX4-3HA</i>	Este estudio
YEB85	BY4741	<i>cln3Δ::URA-kanMX4-3HA</i>	Este estudio
YEB57	BY4741	<i>clb5Δ::URA-hyg</i>	Este estudio
YEB11	BY4741	<i>sic1Δ::URA-kanMX4-3HA</i>	Este estudio
YEB161	BY4741	<i>cln2Δ::URA</i>	Este estudio
YEB181	BY4741	<i>pcl2Δ::URA</i>	Este estudio
YEB185	W303	<i>cln2Δ::URA</i>	Este estudio
YEB184	W303	<i>pcl2Δ::URA</i>	Este estudio
YEB177	BY4741	<i>pcl2Δ::URA, CLB5-3HA</i>	Este estudio
YEB178	BY4741	<i>pcl2Δ::URA, SIC1-3HA</i>	Este estudio
YEB179	BY4741	<i>cln2Δ::URA, CLB5-3HA</i>	Este estudio
YEB180	BY4741	<i>cln2Δ::URA, SIC1-3HA</i>	Este estudio
YRC1004	YPH499	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3- Δ200 leu2-Δ1</i>	UPF

YEB120	YPH499	<i>pcl2Δ::URA-kanMX4</i>	Este estudio
YRC1005	1700		UAB
YEB121	1700	<i>pcl2Δ::URA-kanMX4</i>	Este estudio

Tabla 1. Cepas utilizadas en esta tesis.

4.2 Secuencia 3HA modificada

La secuencia 3HA está compuesta por 3 repeticiones de la secuencia de la hemaglutinina del virus de la gripe humano unidas entre sí por diferentes *linkers*. En este proyecto, en el cual se necesitaba amplificar por PCR esta secuencia, se planteó un inconveniente a la hora de diseñar los oligonucleótidos que se unieran al último HA, ya que al presentar 3 repeticiones prácticamente idénticas a nivel genómico, el oligonucleótido podría unirse a cualquiera de ellas y los productos que han de recombinar en esta región podrían hacerlo en cualquiera de las repeticiones. Este problema se solventó modificando la secuencia del segundo y tercer HA, mediante el intercambio de codones redundantes (Figura 5) e introduciendo la secuencia completa de 3HA modificada en el oligonucleótido de amplificación.

	SECUENCIA HA CON MUTACIONES	LINKERS	STOP
HA1:	TAC CCA TAC GAT GTT CCT GAC TAT GCG	GGC	
HA2:	TAT CCG TAT GAC GTC CCA GAT TAC GCA	GGA TCC	
HA3:	TAT CCG TAT GAC GTC CCA GAC TAC GCT	GCT CAG TGC	TGA

Figura 5. Secuencia 3HA modificada. En rojo se muestran los codones modificados respecto a la secuencia original.

La secuencia resultante de cambiar estos codones favorecía la unión de los posteriores oligonucleótidos al último HA ya que era la secuencia de mayor complementariedad y reducía la probabilidad de que se dieran recombinaciones en repeticiones no deseadas (Figura 6).

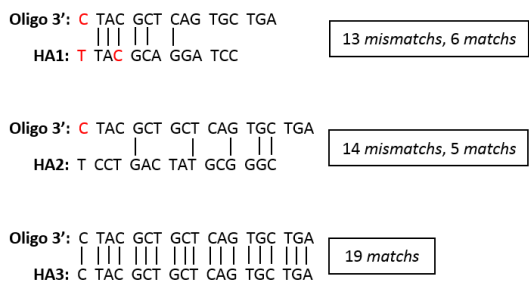


Figura 6. Alineamiento entre la secuencia 3HA modificada y el oligonucleótido 3'. En rojo se muestran las bases nitrogenadas modificadas. La secuencia del oligonucleótido 3' se muestra en dirección 5' --> 3'.

4.3 Plásmido pGEX6p1-URA-kanMX4-3HA

El plásmido pGEX6p1-URA-kanMX4-3HA se obtuvo a partir de la extracción de la secuencia *KIURA3-kanMX4* por PCR del plásmido pCORE-UK (Storici et al. 2001), seguida de una secuencia 3HA modificada que se introdujo en el oligonucleótido de amplificación (Tabla 2).

El plásmido pGEX6p1 se cortó con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI (*New England BioLabs*) y el inserto *KIURA3-KanMX4-3HA* se introdujo mediante recombinación.

Oligonucleótidos	Secuencia
Oligo 5'	CAGGGGCCCTGGGATCCTTCGTACGCTGCAGGTCGAC
Oligo 3'	GAGTCGACCCGGGAATTCAGCACTGAGCAGCGTAGT CTGGGACGTCATACGGATAGGATCCTGCGTAATCTGGG ACGTCATACGGATAGCCCGCATAGTCAGGAACATCGTA TGGGTAACCGCGCGTTGGCCGATTCAT

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la obtención de pGEX6p1-KIURA3-kanMX4-3HA. Se muestra en color azul las colas de recombinación a pGEX6p1, con las dianas de restricción *EcoRI* en el oligonucleótido 5' y *BamHI* en el 3'. En negro la secuencia de hibridación a los plásmidos pCORE UH o UK. En rojo subrayado y en negrita las bases modificadas en la secuencia de 3HA.

4.4 Condiciones de crecimiento

Las células crecieron en los siguientes medios:

- YPD (1% *yeast extract*, 2% peptona y 2% de glucosa).
- SD (0,67% *yeast nitrogen base*, 0,5% NH_4SO_4 , 2% glucosa y suplementado con amino ácidos según requerimientos de auxotrofías).
- Medio compuesto por malta (Batch 5396, *Bulldog Brews*). Medio compuesto por glucosa, fructosa y extracto de malta, cuyas concentraciones exactas se desconocen. Se utilizó una dilución en agua al 60%.

4.5 Selección de transformantes en medio 5-FOA

La selección de transformantes que pierden el doble marcador *KIURA3-kanMX4* se realiza mediante comparación de colonias que crecen en medio YPD suplementado con ácido fluoroacético o 5-FOA (células que han perdido el marcador *URA3*) y no en geneticina (células que han perdido el marcador *kanMX4*). El 5-FOA se convierte en un producto letal para la

levadura si esta contiene el gen *URA3*, que codifica para la decarboxilasa orotidin 5'-fosfato, enzima responsable de catalizar la síntesis de ribonucleótidos pirimidina. Si la levadura contiene el gen *URA3*, la enzima convertirá el 5-FOA en 5-fluorouracil, lo que provocará la muerte de las células portadoras (Boeke et al. 1987).

4.6 Experimentos de sincronización

Para sincronizar las células en G1, los cultivos de levaduras se crecieron en YPD, SD o malta a una densidad de 1×10^7 células/mL. A continuación, se trataron con α -factor (péptido sintetizado por la empresa *Biomedal*) a una concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 100 min. Seguidamente, se centrifugaron las células a 2000 rpm durante 2 min para eliminar el medio con α -factor y se resuspendieron en medio atemperado sin α -factor, este proceso se repitió una vez más a fin de descartar posibles trazas de α -factor. Una vez de nuevo resuspendidas las levaduras, se empezó el muestreo.

4.7 Citometría de flujo

Para el análisis por citometría de flujo, las células se fijaron en etanol 70% y se trataron durante toda la noche a 30°C con RNAsa (*QIAGEN ref. 19101*) a una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en citrato sódico 50 mM. Posteriormente, se tiñeron las células con yoduro de propidio a una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se analizaron en el citómetro de flujo (FACS Calibur; *Becton Dickinson*). Como soporte de visualización se utilizaron los programas *WinMDI 2.9* y *Flowing Software*.

4.8 Índice de gemación

El índice de gemación se determinó microscópicamente contando 100 células. Se determinó como el inicio de la gemación el momento en el que este índice alcanzaba el 10%.

4.9 Extractos celulares e análisis por inmunoblot

Las células se trataron con ácido tricloroacético a una concentración final del 10% durante 10 min, se centrifugaron a 14000 rpm durante 1 minuto, los sedimentos resultantes se resuspendieron en 50% SDS, 42 mM Tris-HCl a pH 6,8 y las células se lisaron con bolas de vidrio (*Sartorius, BBI-8541701*) al 80% de potencia durante 30 segundos, dos veces. Seguidamente, se hirvieron las muestras a 90°C durante 5 min, se corrió una cantidad igual a $OD_{660} = 0,3$ por muestra a 90V durante al menos 2,5 horas en geles de poliacrilamida/SDS al 10% y finalmente, se transfirió a membranas de PVDF (*Immobilion-P, Millipore*) durante 2 horas a 1A.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-HA 1:100 (clon 12CA5, monoclonal), anti-PSTAIRE 1:5000 (Sigma, P7962, monoclonal), anti-Ty1 monoclonal 1:2000 (Sigma), anti-Flag monoclonal 1:500 (Sigma), anti-His 1:2000 (Qiagen, monoclonal) y anti-G-6-PDH 1:500 (Sigma, A9521, policlonal). Mientras que los anticuerpos secundarios fueron *donkey anti-mouse-HRP* y *goat anti-rabbit-HRP* 1:30000 (*Jackson laboratories*).

La inmunodetección se realizó utilizando *Luminata Forte Western HRP Substrate* (Millipore) y las imágenes se tomaron con *GeneSnap* (Syngene).

4.10 Ensayos de viabilidad

El estudio de la viabilidad se realizó mediante *spotting test*. Las células crecieron durante toda la noche en medio YPD, a partir del cultivo en fase estacionaria se realizaron diluciones seriadas 1:5 a partir de una $OD_{660} = 0,05$ y se sembraron 3 μ L de cada una de las diluciones en placas de YPD o malta.

4.11 Cálculo del tiempo de duplicación

Para el cálculo del tiempo de duplicación, se crecieron las levaduras toda la noche en YPD a 30°C a partir de una $OD_{660} = 0,05$ y exponencialmente a

partir de una $OD_{660} = 0,1$, a una temperatura de 27°C , tomando muestra cada 10 min durante al menos 420 min.

El cálculo del tiempo se realizó para la fase exponencial mediante la siguiente fórmula:

$$\text{tiempo duplicación} = \frac{\ln(2) \cdot \text{unidad tiempo (min)}}{\text{número de duplicaciones}}$$

4.12 Determinación del punto de cruce entre Clb5 y Sic1

Se ha considerado al punto de cruce entre Clb5 y Sic1 como el momento en el que se da *Start*. Para determinar el momento exacto de cruce en aquellos experimentos en los que este punto no coincide con los tiempos de muestreo, se ha recurrido a la extrapolación lineal mediante la siguiente fórmula:

$$y = y_a + (x - x_a) \cdot \left(\frac{y_b - y_a}{x_b - x_a} \right)$$

4.13 Análisis cuantitativo

Para la cuantificación de las bandas obtenidas en los *western blots*, se utilizó el *software Image Studio Lite (LI-COR Biosciencias)*. Los datos obtenidos se corrigieron en función de la cantidad cargada de cada proteína, se normalizaron con el control de carga (PSTAIRES o G-6-PDH) y se relativizaron dando un valor de 100 al valor máximo.

La cantidad de cada proteína hasta el punto de cruce entre Clb5 y Sic1, considerado en este estudio como *Start*, se obtuvo a partir del cálculo del área bajo la curva, utilizando el *software GraphPad Prism 5*.

4.14 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con *GraphPad Prism 5*. Se determinó si las muestras presentaban una distribución normal mediante el test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov; en el caso positivo se compararon todas las muestras entre sí mediante el test ANOVA y en caso de no seguir una distribución normal se utilizó el test de Kruskal-Wallis. El análisis estadístico de comparación de dos poblaciones normalmente distribuidas se realizó mediante *t*-test y para muestras que no seguían una distribución normal se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor <0,05.

4.15 Sistema de trabajo utilizado

Las ciclinas de estudio fueron las presentes en la fase G1 del ciclo celular. Además, también se incluyó a Pcl7, que a pesar de pertenecer a la familia Pho80 y estar involucrado en el metabolismo del glucógeno, presenta una regulación cíclica a nivel de transcrito (Lee et al. 2000). Se descartó a Pcl9 ya que en presencia de α -factor reprime su expresión (Measday et al. 1997; Tennyson et al. 1998; Roberts 2000 y confirmado por nuestro grupo, datos no mostrados). También se descartó a Clg1, ya que se trata de una ciclina no regulada cíclicamente, sus niveles de expresión son muy bajos y su delección no ocasiona ningún fenotipo (Matsumoto & Wickner 1993).

Para comprender cómo se han obtenido los resultados de esta tesis, se muestra a modo resumen la Figura 7. En ella se muestra el procedimiento seguido en el tratamiento de las levaduras y la obtención de las muestras para *western blot*, citometría de flujo e índice de gemación (Figura 7A). También se puede observar que las diferentes cepas se mezclan en un mismo tubo según la Tabla 3. Este sistema de trabajo presenta las ventajas de que al estar todas las proteínas marcadas exactamente igual y al poder correr todas las proteínas en un mismo gel, se va a poder usar un único anticuerpo para la detección y se van a poder analizar todas las proteínas a la vez en una única membrana de *western blot*.

La Figura 7B muestra una imagen de *western blot* representativa de los experimentos realizados. En ella se pueden observar todas las ciclinas analizadas en este estudio. A partir de la cuantificación de cada una de estas bandas y su correspondiente normalización con el control de carga se obtienen dos tipos de gráficas: la primera, mostrada en la Figura 7C, da información acerca del patrón de expresión durante la progresión del ciclo celular de cada ciclina y de cuándo se da el cruce entre Clb5 y Sic1, lo que determinamos como *Start*; la segunda (Figura 7D), aporta información acerca de qué ciclinas son las más abundantes hasta *Start*.

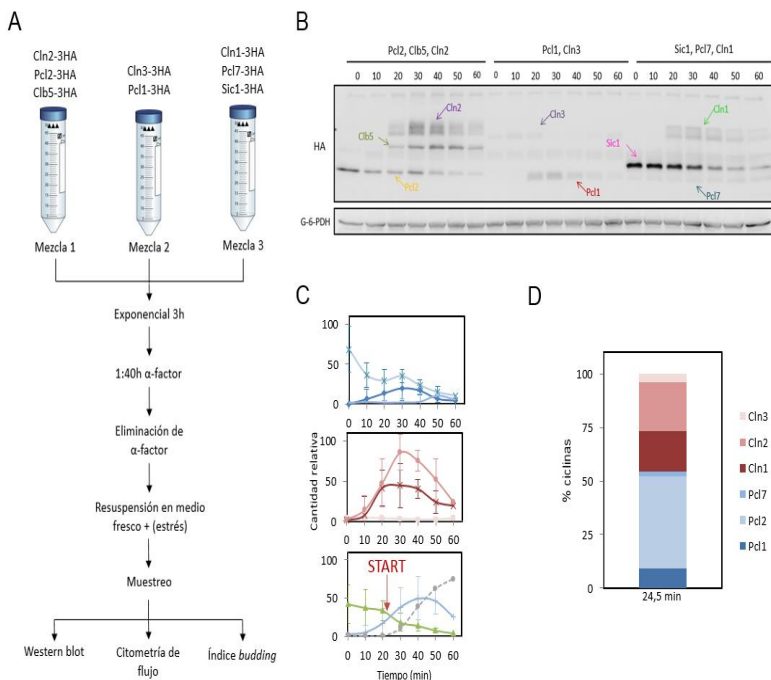


Figura 7. Esquema de trabajo (A) Después de incubar las cepas individualmente durante 17 horas en medio YPD a 30°C, se realiza una exponencial de 3 horas mezclando las cepas en 3 tubos diferentes, se añade α -factor a cada mezcla durante 1 hora y 40 min y se liberan las células en el medio correspondiente, comenzando el muestreo para posteriormente analizar por *western blot*, citometría de flujo y gemación. **(B)** Imagen representativa de un western blot en el que se muestran todas las bandas correspondientes a las ciclinas de este estudio **(C)** Gráficas representativas del patrón de expresión obtenido tras la cuantificación de cada ciclina y Sic1. **(D)** Gráfica representativa que muestra la cantidad de cada ciclina de G1 hasta Start.

Mezcla	Ciclina	OD₆₆₀	OD_{total}
1	Pcl2-3HA	0,1	0,3
	Clb5-3HA	0,1	
	Cln2-3HA	0,1	
2	Pcl1-3HA	0,1	0,3
	Cln3-3HA	0,2	
3	Cln1-3HA	0,05	0,3
	Pcl7-3HA	0,1	
	Sic1-3HA	0,15	

Tabla 3. Absorbancia seleccionada para cada ciclina

5. RESULTADOS

5.1 Estrategia de marcaje

Al inicio de este proyecto, se planteó la posibilidad de que el terminador de un gen presentara funciones reguladoras y que su alteración a la hora de introducir una etiqueta pudiera estar afectando de alguna manera a la expresión proteica de la levadura. Por este motivo se decidió que el marcaje de las ciclinas debía cumplir dos requisitos indispensables: el primero era marcar todas las ciclinas de estudio con la misma etiqueta, a fin de poderlas cuantificar y comparar de la misma manera, y el segundo era que la expresión de la proteína fuera lo más fidedigna posible.

Para ello, se marcaron diversas ciclinas siguiendo dos estrategias diferentes: en la primera, se incorpora una etiqueta junto a un marcador de selección, delecionando una pequeña parte del terminador del gen y desplazando el 3'UTR (Figura 8A). Esta estrategia se encuentra ampliamente utilizada en la mayoría de laboratorios dedicados a la genética de *S. cerevisiae* (Rothstein 1983). La segunda estrategia resulta de una modificación de la técnica de *Il delitto perfetto* (Storici et al. 2001) e introduce una etiqueta al final del gen sin alterar en absoluto el contexto 3'UTR (Figura 8B). En esta segunda estrategia, la región codificante del gen es primeramente substituida por un *cassette* que contiene un doble marcador de selección (*KIURA3-kanMX4*) y un pequeño tag *3HA*, para posteriormente ser reintroducida de nuevo quedando marcada con *3HA* antes del codón de *STOP* y con la región 3'UTR intacta.

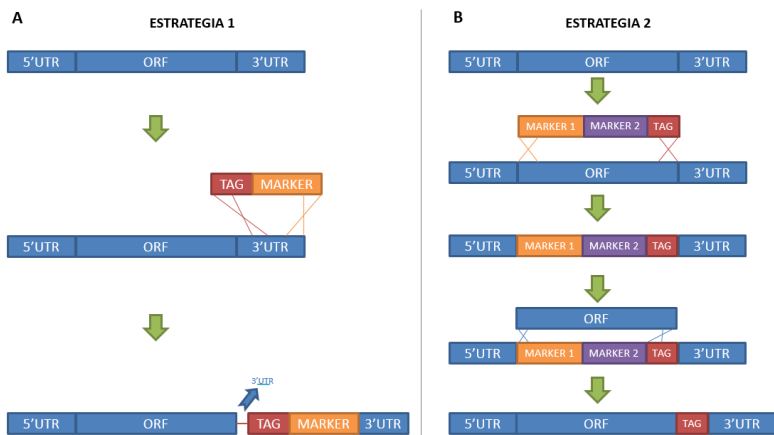


Figura 8. (A) Mediante la estrategia 1, en un único paso de transformación, se introduce una etiqueta y un marcador de selección en el terminador de un gen delecionando parte de este terminador y desplazando el resto. **(B)** En la estrategia 2 se realizan dos rondas de transformación, una primera en la que el gen de interés es delecionado por un *cassette* que contiene dos marcadores de selección y una segunda en la que se reintroduce el gen con la etiqueta, manteniendo intacto el terminador del gen.

La estrategia de marcaje de las ciclinas manteniendo intacto el 3'UTR comienza con la obtención del plásmido molde, a partir del cual se realiza el primer paso de deleción de la región codificante. Para ello se utilizó el plásmido pCORE UK del cual se extrajo el *cassette* *KIURA3-kanMX4* y al cual se le añadió la secuencia *3HA* modificada en el oligonucleótido utilizado para amplificar. Los oligonucleótidos utilizados para extraer este *cassette* contenían unas colas de recombinación para pGEX6p1 con las dianas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI, que se usaron para introducirlo mediante recombinación en un plásmido pGEX6p1 cortado por estas mismas enzimas. Posteriormente, se realizó la transformación de este plásmido en bacterias *E. coli* DH5 α y se extrajo el plásmido mediante miniprep, a fin de aumentar la cantidad de material de trabajo (Figura 9).

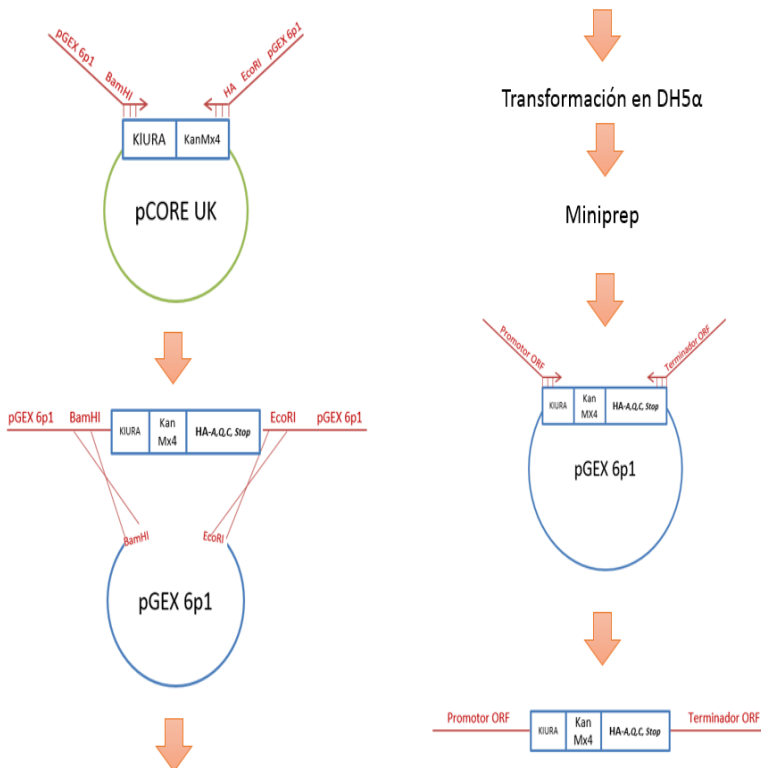


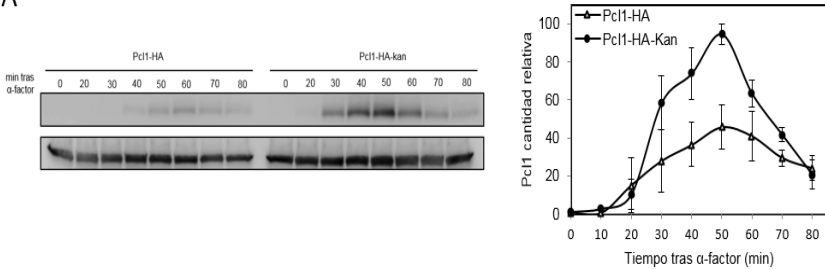
Figura 9. Esquema del proceso de obtención de pGEX6p1-KIURA3-kanMX4-3HA. El *cassette* *KIURA3-kanMX4* se extrae del plásmido pCORE UK y se le añade una secuencia extra con 3HA modificado contenida en el oligonucleótido de amplificación. A continuación, es recombinado en pGEX6p1 por la dianas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI.

Este plásmido se utilizó como molde para obtener todas las ciclinas etiquetadas de este estudio.

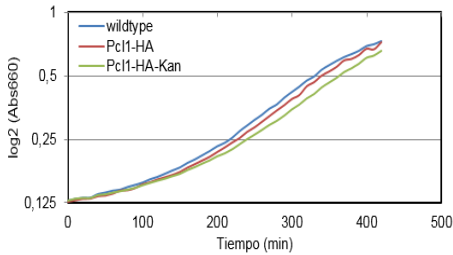
5.2 El 3'UTR regula la expresión de Pcl1

Para confirmar cuál de las dos estrategias de marcaje de un gen alteraba menos a la expresión de la proteína y a la célula, se etiquetó a Pcl1 de las dos formas, manteniendo el 3'UTR intacto (Pcl1-HA) y modificando el 3'UTR (Pcl1-HA-kan). La Figura 10A demuestra que entre las dos estrategias de etiquetado existe una expresión diferencial de Pcl1 entre las dos estrategias de marcaje, siendo mayor la expresión mostrada por el marcaje en el que el 3'UTR se ve modificado. También se observó que el tiempo de duplicación para la cepa Pcl1-HA-kan era significativamente superior al de una cepa salvaje. Mientras que la cepa marcada sin alterar la 3'UTR mantenía el tiempo de duplicación del salvaje (Figura 10B, C). Este resultado indica que la integridad del 3'UTR es necesaria para la correcta regulación génica y que esta región no traducida del gen juega un papel regulatorio importante en la expresión proteica, no descrito hasta el momento.

A



B



C

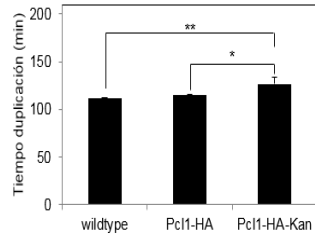


Figura 10. A) Patrón de expresión de Pcl1-HA y Pcl1-HA-kan en salida de α -factor. Las células crecieron toda la noche en YPD, exponencialmente durante 3 horas, se incubaron con α -factor durante 1 hora y 40 min y se resuspendieron en YPD atemperado, se extrajo muestra cada 10 min hasta 80 min. Se muestra la imagen representativa de un *western blot* y la cuantificación de los datos \pm SEM correspondiente a 4 experimentos independientes. **B) Incremento de densidad óptica del salvaje, Pcl1-HA y Pcl1-HA-kan en crecimiento exponencial.** Las células crecieron toda la noche en YPD y a partir de una Abs₆₆₀=0,1 se muestreó cada 10 min durante 420 min a una temperatura de 27°C. **C) Tiempo de duplicación del salvaje, Pcl1-HA y Pcl1-HA-kan.** Se muestra los datos \pm SEM de 3 experimentos.

5.3 La etiqueta 3HA respeta la expresión de Pcl1

Con el fin de testar si el tamaño o la naturaleza de la etiqueta afectaban a la cantidad de la proteína, se probaron 4 tags diferentes. Todos ellos eran de pequeño tamaño (entre 1 y 3kDa) a fin de evitar al máximo posibles impedimentos estéricos que pudieran alterar la interacción de la proteína etiquetada con otras moléculas y por lo tanto, su funcionalidad (Hoffmann et al. 2005). Las etiquetas seleccionadas a tal fin fueron: 6x HIS (una secuencia de 6 histidinas), una secuencia flag (basado en la secuencia DYKDDDDK), una secuencia Ty (basada en la secuencia EVHTNQDPLD) y un tag 3HA, formado por la repetición de 3 secuencias de la hemaglutinina del virus de la gripe humano. Se marcó Pcl1 con las 4 etiquetas, se sincronizaron las células en G1 y se evaluó la cantidad de Pcl1 mediante experimentos de *western blot*. A pesar de que las etiquetas 6His, Flag y Ty son comúnmente utilizadas en el trabajo con cultivos celulares, en el caso de la levadura, ninguna de estas etiquetas se pudieron utilizar, ya que en el caso de Ty, no presentaba señal. Además, a este marcador hay que añadir el agravante de que la levadura presenta Ty endógeno y esto da una señal muy potente que dificulta la visualización de otros elementos marcados con esta etiqueta, y más aún, si estos elementos presentan una baja expresión. En el caso de Flag y 6His, se observó la presencia de muchas bandas inespecíficas que no permitían determinar cuál de ellas correspondía a Pcl1, además de que todas ellas presentaban la misma cantidad a lo largo de una liberación de α -factor, cuando es sabido que esta ciclina presenta un carácter cíclico y que a tiempo 0 tras su liberación no hay Pcl1 (Espinoza et al. 1994; Measday et al. 1997; Hernández-Ortega et al. 2013). Finalmente, la etiqueta 3HA fue la que presentó una mejor detección y permitía observar el carácter cíclico de Pcl1 (Tabla 4). Por lo que esta última etiqueta fue la seleccionada para el marcaje de las proteínas utilizadas en esta tesis.

TAG	Tamaño (kDa)	Señal
6His	1kDa	Presencia de inespecíficas, homogénea
Flag	1kDa	Presencia de inespecíficas, homogénea
Ty	1kDa	No, Ty endógeno
3HA	3kDa	Sí, cíclica

Tabla 4. Etiquetas probadas en la selección del tag

5.4 Las ciclinas marcadas respetando el 3'UTR se comportan igual

Para la realización de los experimentos de esta tesis se hacía necesario confirmar que todas las ciclinas de estudio, que habían sido manipuladas para introducir un marcador sin alterar la 3'UTR, presentaban los mismos tiempos de duplicación, a fin de poder comparar su cantidad en momentos concretos del ciclo.

Tal como muestra la Figura 11, los tiempos de duplicación entre las diferentes ciclinas son los mismos, lo que indica que todas progresan por el ciclo celular del mismo modo y que todas las cepas son aptas para este estudio.

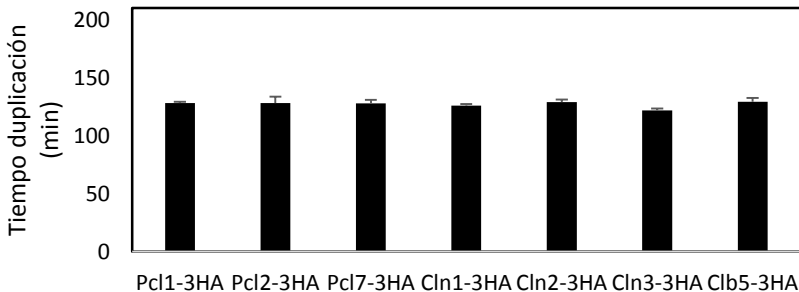


Figura 11. Tiempo de duplicación de las ciclinas de este estudio. Las células crecieron toda la noche en YPD y exponencialmente a partir de una $OD_{660} = 0,1$, a una temperatura de 27°C , tomando muestra cada 10 min durante 900 min. Se muestra los datos \pm SEM de 3 experimentos.

5.5 Pcl's y Cln's presentan la misma cantidad en condiciones normales de laboratorio

Debido a que existe una ausencia de información cuantitativa sobre qué ciclina o ciclinas poseen mayor representación en condiciones normales de laboratorio, es decir, en abundancia de nutrientes, se realizó un primer experimento a fin de arrojar luz a esta cuestión y a su vez servir de control a la sucesión de experimentos que se detallarán durante el desarrollo de esta tesis. En este primer experimento, las células se hicieron crecer en medio YPD a 30°C, reproduciendo un ambiente favorable para la levadura, donde la abundancia de nutrientes, la osmolaridad, el pH o la temperatura no supusieran un problema para su correcto desarrollo.

Como se puede observar en la Figura 12A, Pcl1 presenta su mayor expresión a tiempo 30 min, después de liberar de α -factor. Pcl2 encuentra su máxima expresión a tiempo 0, momento en el cual empieza a disminuir su cantidad y Pcl7 prácticamente no se expresa hasta tiempo 40 min, lo que confirma su regulación cíclica ya descrita por Lee et al. en el 2000. Por otro lado, Cln1 y Cln2 tienen su pico a los 30 min y Cln3 se mantiene estable y a unos niveles muy bajos. El momento en el cual Clb5 y Sic1 se cruzan, el cual denominamos *Start*, se produce a los 24,5 min, a partir de este momento las células empiezan a gemar y a pasar a fase S (Figura 12B).

La cuantificación de cada ciclina de G1 hasta este punto (Figura 12C) demuestra que la aportación Cln's y Pcl's es de alrededor del 50%. Por otro lado, la representación a nivel individual de cada ciclina comienza con Pcl2, siendo esta la que mayor expresión ha mostrado. A continuación, se encuentran Cln2 y Cln1, ambas con un nivel de expresión muy similar. La siguiente ciclina de mayor expresión es Pcl1. Y por último, se encuentran a Cln3 y Pcl7 con únicamente un 4% y 2% de representación, respectivamente (Figura 13).

Esta contribución por igual a nivel cuantitativo en condiciones normales de laboratorio sorprende ya que siempre se le ha atribuido mayor importancia a la CDK Cdc28, dejando en un segundo plano a Pho85 y etiquetándola de CDK accesoria. Este resultado sugiere que ambas CDK's podrían estar realizando funciones distintas en la progresión por G1, o que

ambas actúan en el mismo sentido y al mismo nivel en el paso por G1, dotando a la célula de un mecanismo altamente robusto.

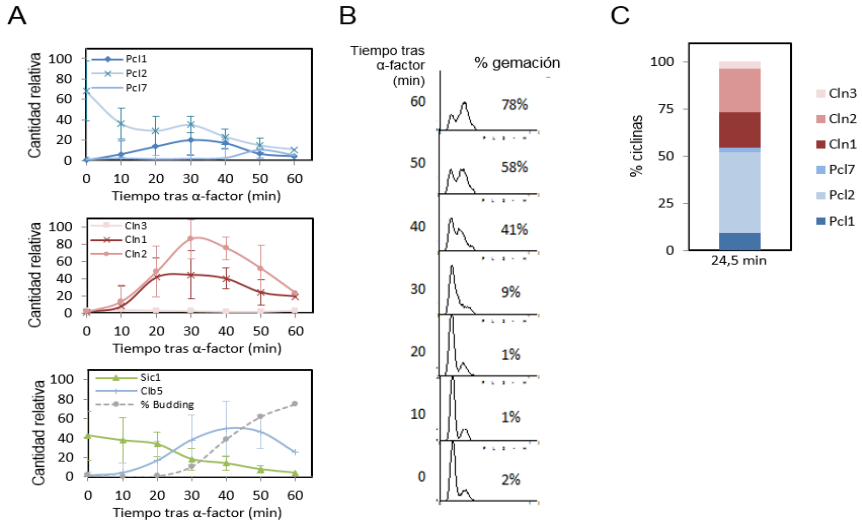
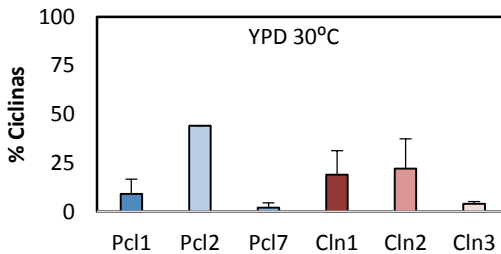


Figura 12. YPD a 30°C (A) Patrón de expresión de Pcl's, Cln's y punto de cruce entre Sic1 y Clb5 indicando el paso a fase S. Las células crecieron exponencialmente durante 3 h en YPD a 30°C, se sincronizaron con α -factor durante 100 min, se resuspendieron en YPD atemperado a 30°C y se tomaron muestras a los tiempos indicados para *western blot*, FACS y gemación **(B)**. Se muestra los datos \pm SEM de 4 experimentos. **(C)** Porcentaje de las diferentes ciclinas de G1 desde tiempo 0 a tiempo 24,5 min, correspondiente al punto de cruce de Sic1 y Clb5.



5.6 La cantidad de Pcl's aumenta en YPD a 37°C

La temperatura óptima de crecimiento de *S. cerevisiae* oscila entre 25 y 30°C. Un aumento de la temperatura a más de 36°C es considerada un estrés para la célula, y si el aumento es superior a 42°C la levadura deja de duplicarse debido a la inactivación de la RNA polimerasa II, lo que produce su inviabilidad (Yamamoto et al. 2008; Morano et al. 2012). Ante esta situación estresante, la célula activa su mecanismo de respuesta a estrés sintetizando un conjunto de proteínas específicas, denominadas proteínas *heat shock* (HSPs), cuyos genes que las codifican contienen en sus promotores secuencias denominadas *heat shock elements* (HSE) y que son activados por factores de transcripción expresados bajo estrés térmico y que favorecerán la termotolerancia. Entre las proteínas que constituyen a HSPs se encuentran gran cantidad de chaperonas, que plegarán las proteínas para protegerlas de la degradación o las desplegarán para ser marcadas mediante ubiquitinación y ser degradadas, previniendo la acumulación de proteínas aberrantes (Verghese et al. 2012).

Siguiendo el procedimiento detallado en materiales y métodos, a excepción del crecimiento de las células en exponencial y la liberación tras α -factor y posterior muestreo, que esta vez se realizó a 37°C, se obtuvo el resultado mostrado en la Figura 14A, en el cual se puede observar que el perfil de expresión de las ciclinas queda adelantado 10 min en todos los casos en relación a la situación control (Figura 12A), desplazando los puntos máximos de Pcl1, Cln1 y Cln2 a 20 min. Mientras que Pcl7 empieza a aumentar su expresión a 30 min y Cln3 mantiene su perfil constante y de baja expresión. En este caso, *Start* también se encuentra adelantado y lo observamos a los 17 min de liberar las células de α -factor, momento a partir del cual las células empiezan a gemar.

La cuantificación de las ciclinas de G1 hasta *Start* (Figura 14C) muestra que la aportación de Pcl's en este caso aumenta hasta un 70%, dejando a las Cln's con un 30% de la participación. A nivel individual, la máxima representación le corresponde a Pcl2, seguida de Cln2, Pcl1 y Cln1, que en estas condiciones ha disminuido su expresión de un 19% en la situación control (Figura 13) a un 7% y se pone al mismo nivel que Pcl7, que en este caso ha aumentado. Por otro lado, Cln3 no parece verse afectado.

Este resultado describe por primera vez una situación en la que los complejos Pho85-Pcl presentan mayor participación que los complejos Cdc28-

Cln's, sugiriendo que el complejo Pho85-Pcl podría tener un papel importante en la adaptación a estrés térmico.

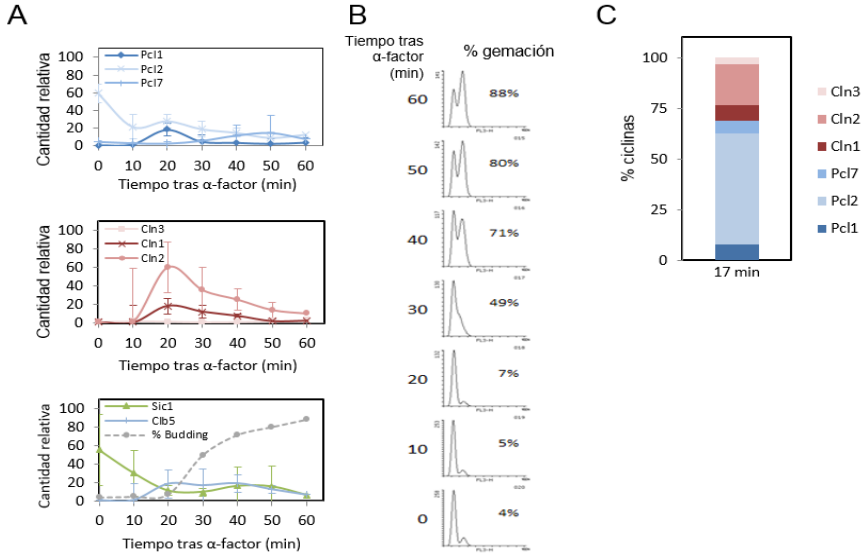
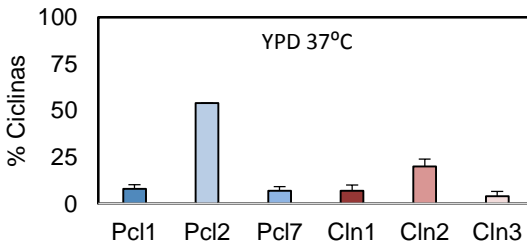


Figura 14. YPD a 37°C. (A) Patrón de expresión de Pcl's, Cln's y punto de cruce entre Sic1 y Clb5, indicando el paso a fase S. Las células crecieron exponencialmente durante 3 h en YPD a 37°C, se sincronizaron con α -factor durante 100 min, se resuspendieron en YPD a temperatura a 37°C y se tomaron muestras a los tiempos indicados para *western blot*, FACS y gemación **(B)**. Se muestra los datos \pm SEM de 3 experimentos. **(C)** Porcentaje de las diferentes ciclinas de G1 desde tiempo 0 a tiempo 17 min, correspondiente al punto de cruce de Sic1 y Clb5.



5.7 La cantidad de Pcl's aumenta cuando se da un *heat shock* a 37°C

A diferencia del apartado anterior, en este apartado se añadió el estrés térmico justo en el momento en el que se liberaron las células de α -factor. Para ello, las células se crecieron exponencialmente a 30°C y la liberación de α -factor se realizó a 37°C, sometiendo a la célula a un *heat shock*. De este modo, se obligó a las levaduras a sintetizar las proteínas de termotolerancia (HSPs) en la fase G1 y no se les dio tiempo de adaptarse a esta condición térmica durante la fase exponencial previa.

En respuesta a estas condiciones ambientales, se observa un máximo de expresión para Pcl1 a 30 min, tras la liberación de α -factor. Pcl2 sigue un patrón en el que empieza con unos niveles altos para empezar a descender y volver a recuperarlos hasta 40 min, donde presenta un máximo de expresión. En cuanto a Pcl7, encontramos que sus niveles empiezan a aumentar a partir de 20 min. Cln1, al igual que Pcl1, presenta su máximo a 30 min. Cln2 presenta un patrón más retrasado en el que alcanza su nivel máximo a los 40 min y Cln3 mantiene sus niveles inalterables. El cruce entre Clb5 y Sic1 se da a 30 min, situando *Start* en este punto, momento a partir del cual la célula empieza a gemar y entrar en fase S (Figura 17A, B).

En este caso, la cantidad entre Pcl's y Cln's hasta *Start* se encuentra en un 65% y 35% respectivamente (Figura 17C), niveles muy parecidos a los observados cuando las células eran mantenidas a 37°C y se continuaba manteniendo la misma temperatura para el muestreo después de la liberación de α -factor (Figura 14C). A nivel individual, lo más destacable es el aumento de Pcl7 que aumenta 5 veces respecto a la situación control y el aumento de Pcl1 que pasa prácticamente a expresarse el doble que en la situación control (Figura 13). Pcl2 continúa siendo la ciclina mayoritaria, seguida de Cln2 y Cln1. Mientras que Cln3 mantiene sus niveles estables (Figura 16).

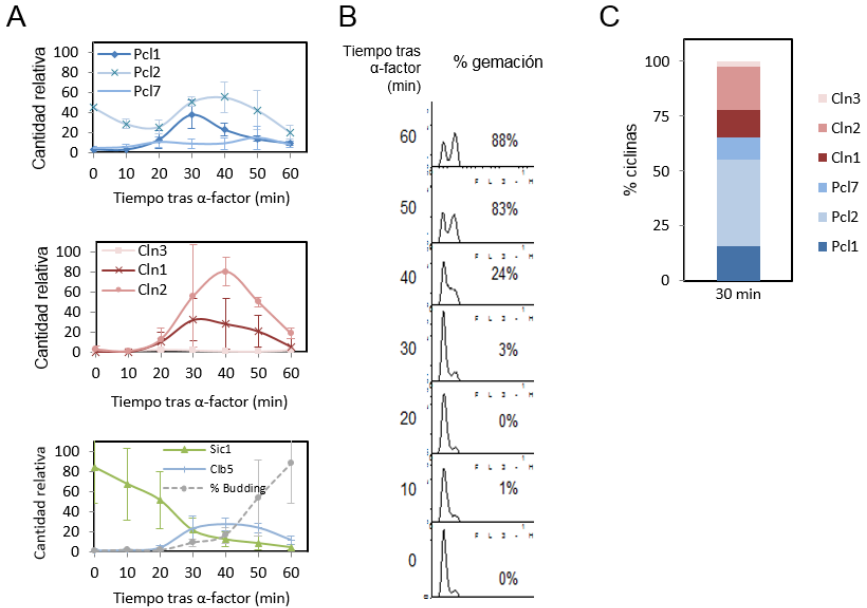


Figura 17. Heat Shock en YPD. (A) Patrón de expresión de Pcl's, Cln's y punto de cruce entre Sic1 y Clb5, indicando el paso a fase S. Las células crecieron exponencialmente durante 3 h en YPD a 30°C, se sincronizaron con α -factor durante 100 min, se resuspendieron en YPD atemperado a 37°C y se tomaron muestras a los tiempos indicados para *western blot*, FACS y gemación **(B)**. Se muestra los datos \pm SEM de 3 experimentos. **(C)** Porcentaje de las diferentes ciclinas de G1 desde tiempo 0 a tiempo 30 min, correspondiente al punto de cruce de Sic1 y Clb5.

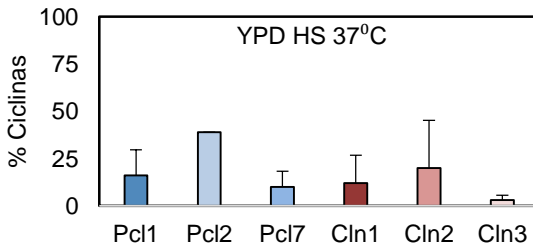


Figura 16. Representación de cada ciclina en YPD con Heat Shock a 37°C. Se muestra el porcentaje de cada ciclina \pm SEM de 3 experimentos.

5.8 En medio mínimo completo las ciclinas de G1 presentan un patrón de expresión normal

Es sabido que el control del crecimiento celular está regulado por nutrientes. Una de las rutas más estudiadas es la vía TOR, que se encuentra conservada en organismos superiores (De Virgilio & Loewith 2006; Loewith & Hall 2011) y que se encuentra activa cuando las condiciones ambientales son adecuadas para iniciar el ciclo celular e inactiva en condiciones de ausencia de nitrógeno (Crespo & Hall 2002; Wullschleger et al. 2006; Lushchak et al. 2017). Otra ruta implicada en la respuesta a nutrientes es la vía Pho, que actúa en respuesta a fosfato (Secco et al. 2012; Tomar & Sinha 2014) o las rutas en respuesta a glucosa Rgt2/Snf3, AMPK y cAMP-PKA (Johnston & Kim 2005; Santangelo 2006; Kim et al. 2013). Por lo que el control de los nutrientes del medio de cultivo utilizado en el trabajo de laboratorio es importante para saber que ruta puede estar implicada en cada situación.

El siguiente experimento se realizó utilizando medio mínimo completo SD, del cual a diferencia del medio YPD, la composición exacta de cada nutriente es conocida.

En este caso, se observa un retraso de 10 min en la progresión del ciclo celular en relación al medio YPD (Figura 12A), presentando tanto Pcl's como Cln's los puntos máximos a los 40 min tras la liberación de α -factor. El punto de cruce entre Clb5 y Sic1 se da a los 37 min, momento a partir del cual empieza a aumentar la gemación, en concreto, a partir de los 44 min (Figura 18A, B).

En cuanto a los niveles de Pcl's y Cln's en la Figura 18C se puede observar que la participación de ambas es igual, del mismo modo que ocurre en medio YPD (Figura 12C). Los niveles de cada ciclina individualmente también se mantienen iguales a los obtenidos en medio YPD (Figura 19). Este resultado no muestra diferencias en la expresión de las ciclinas entre las células crecidas en un medio rico YPD y un medio mínimo completo SD.

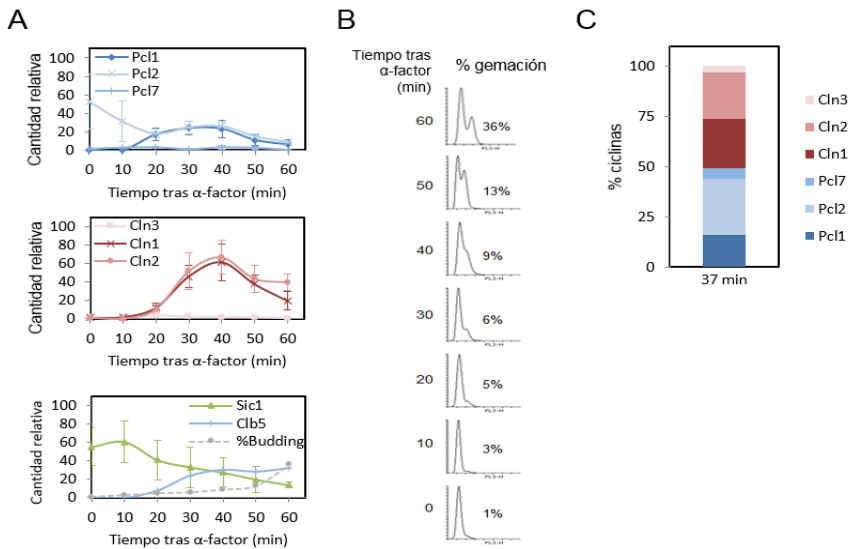


Figura 18. SD a 30°C **A)** Patrón de expresión de Pcl's, Cln's y punto de cruce entre Sic1 y Clb5, indicando el paso a fase S. Las células crecieron exponencialmente durante 3 h en medio SD a 30°C, se sincronizaron con α -factor durante 100 min, se resuspendieron en SD atemperado a 30°C y se tomaron muestras a los tiempos indicados para western blot, FACS y gemación **(B)**. Se muestra los datos \pm SEM de 2 experimentos. **(C)** Porcentaje de las diferentes ciclinas de G1 desde tiempo 0 a tiempo 37 min, correspondiente al punto de cruce de Sic1 y Clb5.

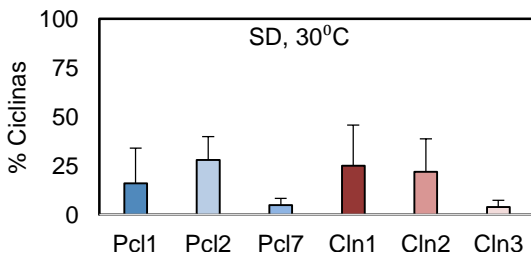


Figura 19. Representación de cada ciclina en SD a 30°C. Se muestra el porcentaje de cada ciclina \pm SEM. de 2 experimentos.

5.9 En respuesta a nutrientes hay un aumento de Pcl's

En estudios anteriores se observó que cuando se sometía a las células a un cambio de medio rico YPD a medio mínimo completo SD en el momento de la liberación de α -factor, se producía un aumento de Pcl1, mientras que Cln2 disminuía (Hernández-Ortega et al. 2013). Por lo que en estas condiciones descritas, en las que las células son forzadas a una rápida adaptación a una situación distinta de nutrientes para empezar el ciclo, se hace interesante comprobar si a parte de Pcl1 también hay un aumento de la cantidad de las demás Pcl's y a parte de Cln2 también disminuyen el resto de Cln's.

Tal y como se observa en la Figura 20A, Pcl1 presenta su máxima expresión a 30 min tras la liberación de α -factor, mientras que Pcl2 disminuye hasta 20 min y a partir de aquí mantiene el nivel de expresión. Pcl7 aumenta ligeramente a partir de los 40 min. Por otro lado, la expresión máxima tanto de Cln1 como de Cln2 se presenta a tiempo 40 min. Y finalmente, Cln3 se mantiene estable a bajos niveles de expresión. En esta situación, el cruce de Clb5 y Sic1 se encuentra a 35 min, situando *Start* en este momento. La gemación comienza 5 minutos antes de *Start* (Figura 20A, B), aunque lo hace a un índice más bajo que en la situación control (Figura 12A, B).

En cuanto a la comparación entre familia Pcl's y Cln's, las primeras aumentan hasta un 65%, mientras que las segundas disminuyen hasta el 35% (Figura 20C) en relación a la situación control, en la que los niveles de ambas familias eran los mismos (Figura 12C). A nivel individual, se confirma el aumento de Pcl1 ya observado por Hernández-Ortega et al. respecto al medio YPD, lo que de nuevo sugiere que juega un papel en la adaptación a nutrientes. Pero por otro lado, no se observa una disminución de la cantidad de Cln2, siendo esta prácticamente igual a la observada en medio YPD. Siguiendo un orden de mayor a menor expresión se encuentra de nuevo a Pcl2 y a Cln2. A continuación, se encuentra a Pcl1 y a Cln1, seguidas muy de cerca por Pcl7 y finalmente a Cln3 (Figura 21), que continúa manteniendo los mismos niveles que en YPD (Figura 13).

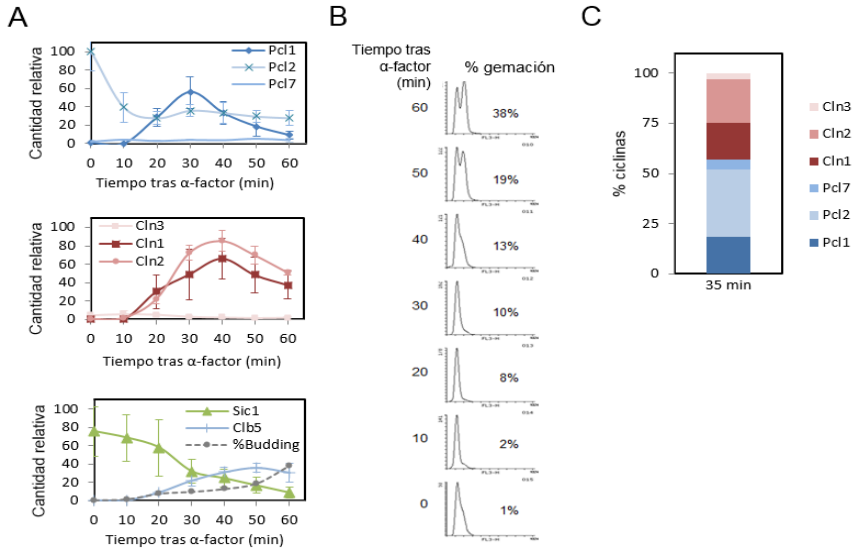


Figura 20. YPD a SD (A) Patrón de expresión de Pcl's, Cln's y punto de cruce entre Sic1 y Clb5, indicando el paso a fase S. Las células crecieron exponencialmente durante 3 h en medio YPD a 30°C, se sincronizaron con α -factor durante 100 min, se resuspendieron en SD atemperado a 30°C y se tomaron muestras a los tiempos indicados para *western blot*, FACS y gemación **(B)**. Se muestra los datos \pm SEM de 2 experimentos. **(C)** Porcentaje de las diferentes ciclinas de G1 desde tiempo 0 a tiempo 35 min, correspondiente al punto de cruce de Sic1 y Clb5.

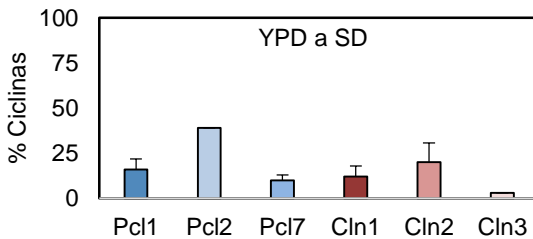


Figura 21. Representación de cada ciclina en cambio de medio YPD a SD a 30°C. Se muestra el porcentaje de cada ciclina \pm SEM de 2 experimentos.

5.10 En medio de cultivo compuesto por malta las ciclinas de G1 presentan un patrón de expresión normal

El medio malta utilizado en este experimento contiene como fuente de carbono glucosa, fructosa y extracto de malta de cebada, que del mismo modo como ocurre con el *yeast extract* su composición exacta es desconocida. El proceso de malteado de la cebada se lleva a cabo sumergiendo el grano en agua para hacerlo germinar y sometiéndolo seguidamente a un secado rápido, de manera que la composición del grano de cebada que inicialmente contenía almidón como glúcido principal, producto no utilizable por la levadura, es transformado enzimáticamente en maltosa. Gracias a la enzima maltasa la levadura transformará una molécula de maltosa en dos moléculas de glucosa que sí que podrá utilizar como fuente de carbono. Durante el proceso enzimático de malteado, también se producen otros elementos como péptidos, vitaminas y minerales que juntamente con la maltosa forman parte del extracto de malta.

Este medio es el más parecido al medio en el que crece una levadura en la naturaleza a nivel de nutrientes, por lo que resulta interesante conocer cómo se expresan las ciclinas de G1 en estas condiciones.

La Figura 22 muestra un comportamiento de Pcl's y Cln's bastante similar al mostrado en medio YPD a 30°C (Figura 12A), con los puntos de máxima expresión de Pcl1, Cln1 y Cln2 a 30 min tras la liberación de α -factor, un descenso de la expresión de Pcl2 hasta 20 min y aumentando este a 30 min para volver a descender. Pcl7 empieza a aumentar a partir de 50 min. Mientras que Cln3 se mantiene inalterable. En este caso, *Start* se ve retrasado hasta 36 min y también se retrasa la gemación (Figura 22A, B) en relación a la situación control (Figura 12A, B).

En cuanto a la cantidad de Pcl's respecto a Cln's, no se observa diferencia (Figura 22C) respecto al medio YPD. Y tal y como muestra la Figura 23 tampoco hay diferencias de cantidad en la expresión a nivel individual de las ciclinas entre las células que crecen en medio compuesto por malta a 30°C y las que lo hacen en medio YPD (Figura 13).

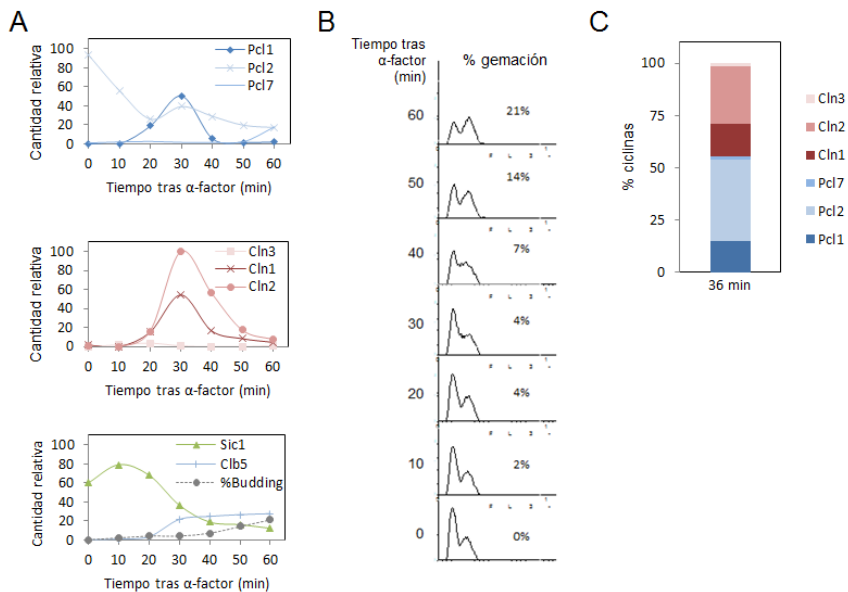


Figura 22. Medio compuesto por malta a 30°C (A) Patrón de expresión de Pcl's, Cln's y punto de cruce entre Sic1 y Clb5, indicando el paso a fase S. Las células crecieron exponencialmente durante 3 h en malta a 30°C, se sincronizaron con α -factor durante 100 min, se resuspendieron en medio compuesto por malta atemperado a 30°C y se tomaron muestras a los tiempos indicados para western blot, FACS y gemación **(B)**. **(C)** Porcentaje de las diferentes ciclinas de G1 desde tiempo 0 a tiempo 36 min, correspondiente al punto de cruce de Sic1 y Clb5.

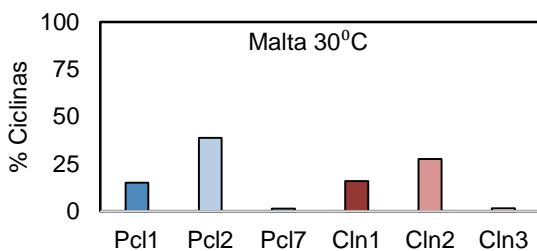


Figura 23. Representación de cada ciclina en medio compuesto por malta a 30°C. Se muestra el porcentaje de cada ciclina.

5.11 La cantidad de Pcl's aumenta drásticamente a 37°C en medio compuesto por malta

En este caso se realizó el mismo experimento que en el apartado 5.6, en el que las células crecieron exponencialmente a 37°C y la liberación de α -factor también se realizó a 37°C. Por lo que se esperaba que en esta situación los genes de respuesta a *heat shock* se encontrasen activados. La única variación que se introdujo con respecto al apartado 5.6 fue el medio en el que crecieron las levaduras, que en este caso lo hicieron en medio compuesto por malta.

Tal y como muestra la Figura 24A, se observa una gran alteración con respecto a las condiciones normales, en la que Sic1 no desciende sus niveles hasta 40 min tras la liberación de α -factor y tanto Pcl's como Cln's se encuentran a unos niveles realmente bajos en relación a los presentados en la situación control (Figura 12A), con especial mención a lo que se refiere a los niveles de Cln's, que entre las 3 no superan el 3% de la representación. Por otro lado, en esta situación las Pcl's han tomado el protagonismo y representan el 97%, siendo Pcl2 la más expresada, seguida de Pcl1 que muestra su mayor expresión a un tiempo temprano de 10 min y por último Pcl7 (Figura 24C). *Start* se encuentra 14,5 min retrasado respecto a la situación control, encontrándolo situado a tiempo 40 min. Mientras que las células han empezado a gemar 18 min antes (Figura 24A, B).

La Figura 25 muestra claramente que en esta situación en la que se ha recreado un ambiente de nutrientes lo más natural posible y a la que se ha aplicado una situación de estrés térmico, el aporte de Cln's es ínfimo y la mayor representación corresponde a las Pcl's, sugiriendo que el complejo Pho85-Pcl, en especial Pcl2 ya que presenta los niveles más elevados, presentan funciones importantes en la respuesta a estrés por temperatura, tal y como ya se había observado anteriormente en los apartados 5.6 y 5.7 correspondientes a YPD a 37°C.

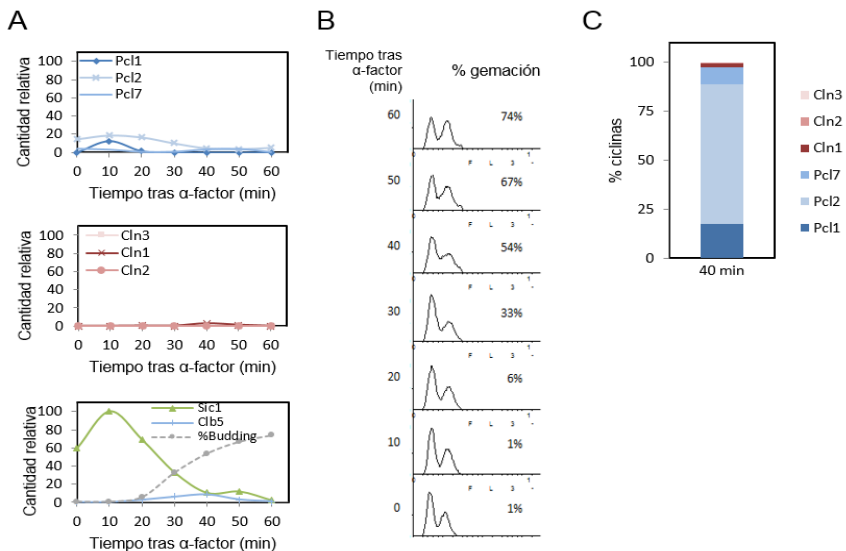


Figura 24. Medio compuesto por malta a 37°C (A) Patrón de expresión de Pcl's, Cln's y punto de cruce entre Sic1 y Clb5, indicando el paso a fase S. Las células crecieron exponencialmente durante 3 h en malta a 37°C, se sincronizaron con α -factor durante 100 min, se resuspendieron en medio compuesto por malta atemperada a 37°C y se tomaron muestras a los tiempos indicados para *western blot*, FACS y gemación **(B)**. **(C)** Porcentaje de las diferentes ciclinas de G1 desde tiempo 0 a tiempo 40 min, correspondiente al punto de cruce de Sic1 y Clb5.

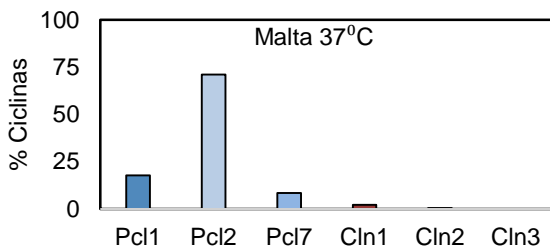


Figura 25. Representación de cada ciclina en malta a 37°C. Se muestra el porcentaje de cada ciclina.

5.12 La cantidad de Pcl's aumenta en medio compuesto por malta con *heat shock* a 37°C

En este caso, la variación con respecto al apartado anterior fue introducir estrés térmico en el momento de la liberación de α -factor, de manera que la levadura debe expresar los genes de respuesta a *heat shock* en fase G1 y adaptarse para poder progresar por el ciclo celular.

En esta situación, tal y como muestra la Figura 26A, el patrón de expresión de las ciclinas tanto Pcl's como Cln's es bastante similar al observado en condiciones normales (Figura 12A), presentando tanto Pcl1 como Cln1 su máxima expresión a 30 min tras la liberación de α -factor, mientras que Cln2 lo hace 10 min más tarde. Pcl2 mantiene su patrón en el que a partir de un máximo inicial va disminuyendo conforme progresa el ciclo y finalmente, Pcl7 y Cln3 mantienen sus bajos niveles. En esta situación, se consideró a *Start* a 90 min, ya que aunque Clb5 prácticamente no parece aumentar la cantidad, Sic1 sí que disminuye conforme evoluciona el tiempo, cruzándose con Clb5 a 90 min. Por otro lado las células empiezan a gemar a 30 min aun índice inferior al mostrado en la situación control (Figura 12A, B). El análisis mediante FACS muestra que a tiempo 60 min la levadura sigue en G1, lo que se relaciona con el bajo índice de gemación y la ausencia de Clb5 (Figura 26B).

En cuanto a la cantidad de Pcl's y Cln's, en estas condiciones hay un claro aumento de Pcl's representando un 85% con un aumento de Pcl2 de un 26% en relación a YPD a 30°C y quedando la representación total de Cln's en solamente un 15%, sugiriendo de nuevo un papel de Pcl2 en la adaptación a estrés térmico.

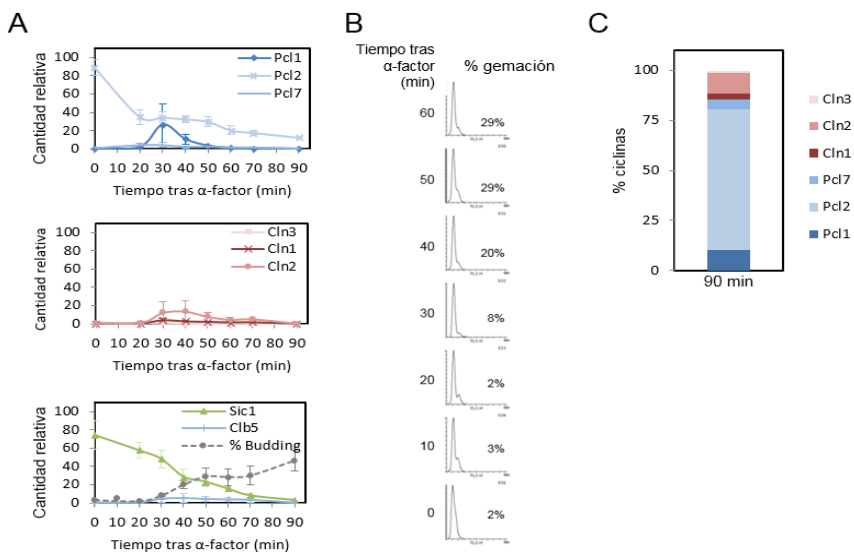


Figura 26. Heat Shock en medio compuesto por malta (A) Patrón de expresión de Pcl's, Cln's y punto de cruce entre Sic1 y Clb5, indicando el paso a fase S. Las células crecieron exponencialmente durante 3 h en malta a 30°C, se sincronizaron con α -factor durante 100 min y se resuspendieron en medio compuesto por malta atemperado a 37°C, tomando muestras a los tiempos indicados para *western blot*, FACS y gemación **(B)**. Se muestra los datos \pm SEM de 4 experimentos. **(C)** Porcentaje de las diferentes ciclinas de G1 desde tiempo 0 a tiempo 90 min, correspondiente al punto de cruce de Sic1 y Clb5.

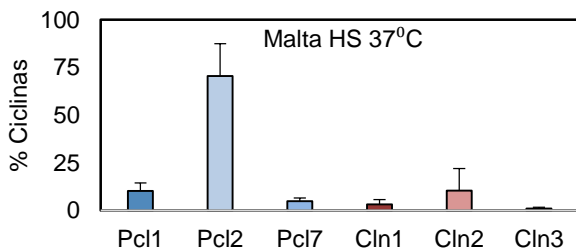


Figura 27. Representación de cada ciclina en malta con heat shock. Se muestra el porcentaje de cada ciclina, \pm SEM de 4 experimentos.

5.13 Bajo estrés osmótico la proporción Pcl's/Cln's es la misma

En condiciones de estrés osmótico la levadura modifica muchos procesos celulares para aumentar la probabilidad de supervivencia, entre ellos encontramos la activación de la vía HOG, que inducirá a la adaptación del citoesqueleto, la modificación de la expresión génica, el acúmulo de glicerol, el aumento de transportadores salinos y el retraso del ciclo celular hasta que la osmotolerancia sea inducida (de Nadal et al., 2002; Hohmann, 2002).

En este contexto, en el que ya se ha descrito que existe alteración de la expresión génica (Hohmann, 2002), se hace interesante observar si las ciclinas de G1 también presentan un patrón alterado en cuanto a su expresión.

En cuanto al patrón de expresión, todas las ciclinas presentan un retraso en su expresión máxima en relación a la situación control (Figura 12A). Pcl1 presenta la expresión máxima a 40 min tras la liberación de α -factor. Pcl2 disminuye a medida que avanza el ciclo. Pcl7 empieza a aumentar a 70 min. Y tanto Cln1 como Cln2 presentan un pico a 50 min (Figura 28A). En este caso, *Start* se encuentra a 55 min, mientras que las células empiezan a gemar a partir de 20 min (Figura 28A, B).

En la Figura 28C, lo más destacable es que Cln3 presenta una expresión aun inferior a la mostrada en YPD a 30°C (Figura 12C), algo ya descrito por Bellí et al. en 2001. Mientras que el resto de ciclinas no parece verse muy afectadas y mantienen unos niveles de expresión dentro de lo normal, manteniendo la misma proporción entre Pcl's y Cln's. A nivel individual, a pesar de que Pcl1 aumenta los niveles hasta un 17% respecto a la situación normal, Pcl2 disminuye hasta un 28% y Pcl7 se encuentra representado en un 3%. Por otro lado, Cln1 y Cln2 mantienen unos niveles similares a los presentados en condiciones normales y Cln3 disminuye hasta un 1% (Figura 29) respecto al 4% mostrado en condiciones normales (Figura 13), representando una disminución de hasta 4 veces en relación a la situación control.

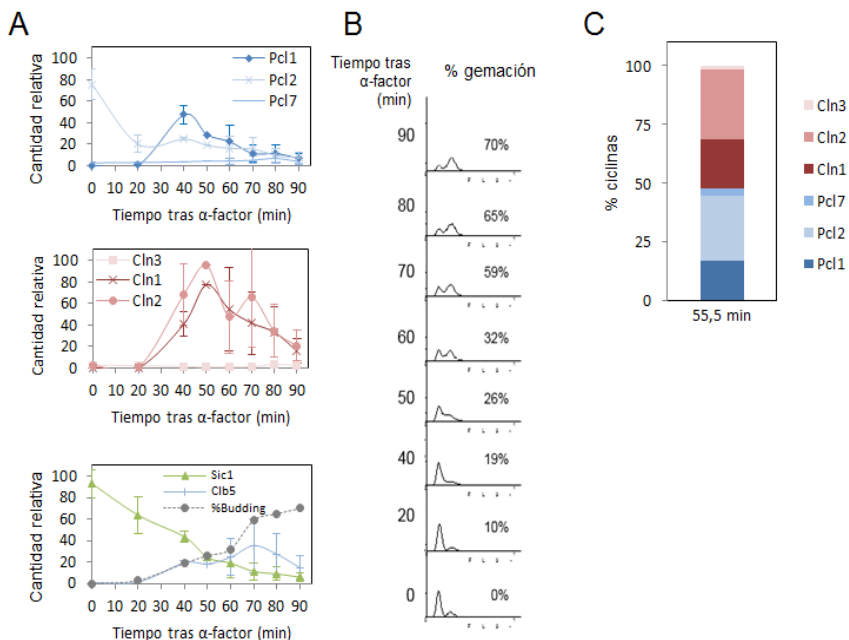


Figura 28. Estrés osmótico (A) Patrón de expresión de Pcl's, Cln's y punto de cruce entre Sic1 y Clb5, indicando el paso a fase S. Las células crecieron exponencialmente durante 3 h en YPD a 30°C, se sincronizaron con α -factor durante 100 min y se resuspendieron en YPD + 0,4 M NaCl atemperado a 30°C, tomando muestras a los tiempos indicados para *western blot*, FACS y gemación **(B)**. Se muestra los datos \pm SEM de 2 experimentos. **(C)** Porcentaje de las diferentes ciclinas de G1 desde tiempo 0 a tiempo 55,5 min, correspondiente al punto de cruce de Sic1 y Clb5.

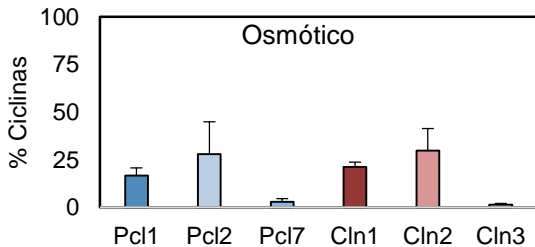


Figura 29. Representación de cada ciclina en estrés osmótico. Se muestra el porcentaje de cada ciclina \pm d.s. de 2 experimentos.

5.14 En estrés oxidativo aumenta la cantidad de Pcl's

El estrés oxidativo es causado por especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*), tales como O_2^- , H_2O_2 o el radical OH^- (Farrugia & Balzan 2012), que pueden producirse por cambios en el ambiente como por ejemplo la presencia de etanol, agua oxigenada o agentes generadores de superóxidos como la menadiona (Kim et al. 2011). En respuesta a estrés oxidativo la levadura despliega una serie de mecanismos tanto enzimáticos (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa) como no enzimáticos (trehalosa) para proteger la integridad celular, manteniendo el potencial redox gracias a la conversión de ROS en oxígeno molecular (Crowe 2007; Farrugia & Balzan 2012).

En células tratadas con 10 μ M menadiona, para infligir daño oxidativo, se observa un retraso en el ciclo (Figura 30B), en el cual las células no progresan a G2 hasta 60 min, mientras que en la situación control este progreso se observa a 40 min (Figura 12B). En estas condiciones, Pcl1 presenta su máxima expresión a los 40 min tras la liberación de α -factor, Pcl2 disminuye hasta tiempo 90 min y Pcl7 empieza a aumentar a partir de los 70 min. Mientras que Cln1 presenta su máxima expresión a los 60 min, Cln2 lo hace 10 min más tarde y Cln3 empieza a aumentar a partir de los 80 min (Figura 30A). Este retraso se relaciona con el momento en el que Clb5 y Sic1 se cruzan que, como es de esperar, también lo hacen más tarde que en situación control, situando *Start* en el minuto 55, mientras que el *Start* morfogénico se ve situado a los 10 min. (Figura 30A y B).

La Figura 30C muestra que en estas condiciones las Pcl's aumentan hasta un 65% y las Cln's disminuyen hasta un 35%; siendo Pcl2 la ciclina más abundante, seguida de Cln2, Pcl1, Pcl7 y Cln3. Finalmente, se encuentra Cln1, que en esta situación presenta solamente un 3% de representación (Figura 31) mientras que en la situación control se encontraba representado en un 19% (Figura 13), lo que supone que en esta situación Cln1 muestra una expresión de prácticamente 6 veces menos que en la situación control.

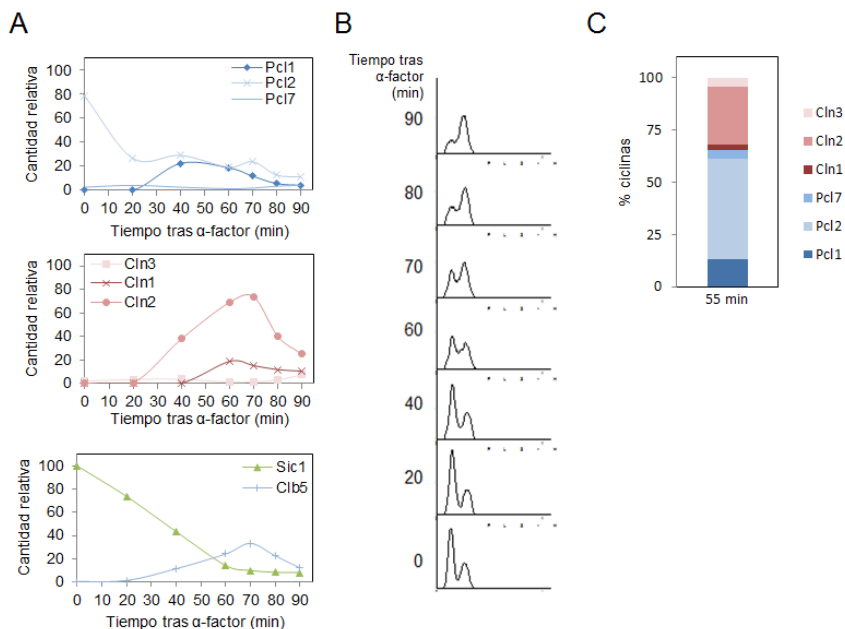


Figura 30. Estrés oxidativo (A) Patrón de expresión de Pcl's, Cln's y punto de cruce entre Sic1 y Clb5, indicando el paso a fase S. Las células crecieron exponencialmente durante 3 h en YPD a 30°C, se sincronizaron con α -factor durante 100 min y se resuspendieron en YPD + 10 μ M menadiona atemperado a 30°C, tomando muestras a los tiempos indicados para *western blot* y FACS **(B)**. **(C)** Porcentaje de las diferentes ciclinas de G1 desde tiempo 0 a tiempo 55 min, correspondiente al punto de cruce de Sic1 y Clb5.

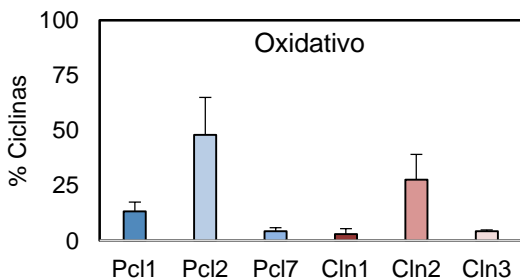


Figura 31. Representación de cada ciclina en estrés oxidativo. Se muestra el porcentaje de cada ciclina.

5.15 Las Cln's aumentan ligeramente bajo estrés reductorivo

El medio intracelular generalmente presenta un ambiente reductor. Para mantener este balance redox, además de los mecanismos comentados en el apartado anterior, la levadura también dispone de otro tipo de enzimas, llamadas oxidorreductasas, que actúan transfiriendo electrones de una molécula donante, generalmente glutatión, a un aceptora, quedando esta última reducida y favoreciendo de este modo al mantenimiento de la homeóstasis redox citoplasmática. La presencia de agentes exógenos reductores como la N-acetil-cisteína desajusta el equilibrio redox, obligando a la célula a aumentar la actividad oxidorreductasa (Trotter & Grant 2002).

En este experimento, se añadió 100 mM de N-acetil-cisteína a las células en el momento de liberarlas de α -factor, para añadir un estrés reductorivo. En esta situación, el patrón de expresión de las ciclinas Pcl's se ve claramente alterado. Pcl1 presenta un retraso de 10 min en su máxima expresión tras la liberación de α -factor en relación a la situación control, mientras que Pcl7 aumenta sus niveles. Aunque lo más llamativo son los bajos niveles de Pcl2 a tiempo 0 y el pico de expresión máxima que muestra en el minuto 50, sugiriendo que bajo estrés reductorivo Pcl2 es inhibido hasta la que la célula se ha adaptado a esta situación. En lo que se refiere a Cln's, Cln3 mantiene sus bajos niveles de expresión, mientras que Cln2 presenta un pico de máxima expresión a los 40 min y Cln1 lo hace a los 50 min (Figura 32A). El punto de cruce entre Clb5 y Sic1 se da a los 33 min, situando *Start* en este punto (Figura 32B).

Esta situación ha sido la única de todas las probadas que muestra una disminución de Pcl's respecto a Clns, viéndose las primeras representadas en un 42% mientras que las segundas lo hacen un 58% (Figura 32C). Individualmente, la ciclina más abundante es Cln2, seguida de Pcl2, Cln1, Pcl1, Pcl7 y por último, Cln3 (Figura 33).

Este resultado sugiere que bajo estrés reductorivo, las Cln's presentan un papel más relevante que las Pcl's en la adaptación a esta situación.

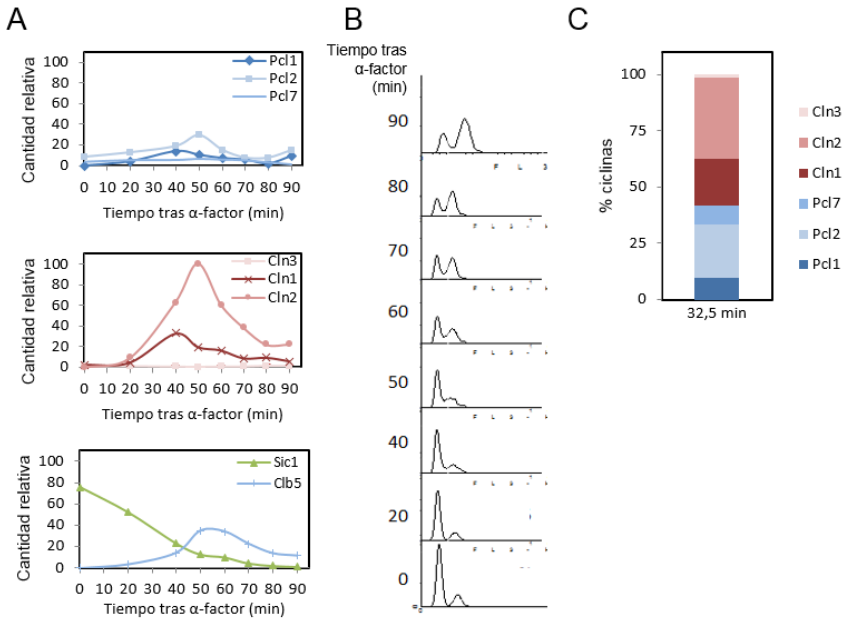


Figura 32. Estrés reductivo (A). Patrón de expresión de Pcl's, Cln's y punto de cruce entre Sic1 y Clb5, indicando el paso a fase S. Las células crecieron exponencialmente durante 3 h en YPD a 30°C, se sincronizaron con α -factor durante 100 min y se resuspendieron en YPD + 100 mM N-acetil-cisteína a temperatura de 30°C, tomando muestras a los tiempos indicados para *western blot* y FACS (B). (C) Porcentaje de las diferentes ciclinas de G1 desde tiempo 0 a tiempo 32,5 min.

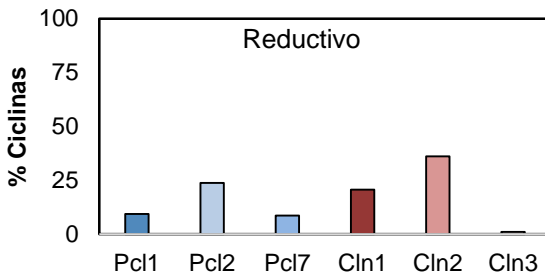


Figura 33. Representación de cada ciclina en estrés reductivo. Se muestra el porcentaje de cada ciclina.

5.16 Representación gráfica general de las condiciones de estudio

A modo de resumen, se muestra la Figura 34 en la que se pueden comparar todas las condiciones probadas y en la que se observa que las condiciones en las que hay más cantidad de Pcl's respecto a Cln's son las de estrés térmico, mientras que en estrés reductor la situación se invierte habiendo más cantidad de Cln's que de Pcl's.

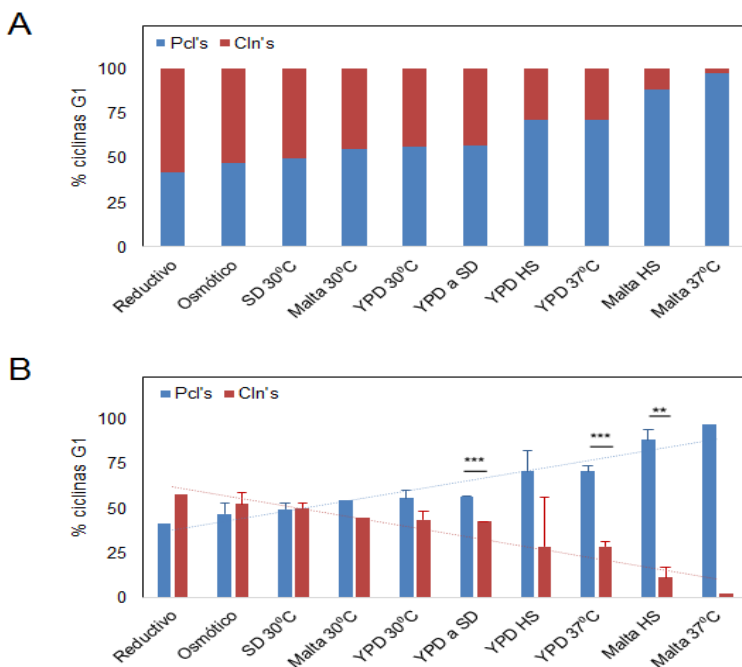


Figura 34. Cantidad de Pcl's y Cln's en las diferentes condiciones probadas. (A) Se muestran las diferentes condiciones ordenadas de menor cantidad de Pcl's a mayor cantidad. **(B)** Representación no apilada de las diferentes condiciones probadas ordenadas de menor a mayor cantidad de Pcl's. El error estándar de la media se muestra para las condiciones en las que al menos había un duplicado, mientras que el test estadístico U de Mann-Whitney se utilizó para comparar las situaciones en que $n \geq 3$, considerando significativo un p-valor $< 0,05$. Como referencia se tomó a YPD a 30°C.

5.17 Estudio de *pcl2Δ* en situación de estrés térmico

Considerando los resultados previos donde se observa un aumento de Pcl's respecto a Cln's en condiciones en las que las células se han sometido a un estrés térmico de 37°C, se hace interesante estudiar la respuesta de la levadura ante esta situación en ausencia de las ciclinas que resultan más abundantes en estas condiciones.

Para simplificar el estudio, se decidió deleccionar de todo el juego de Pcl's únicamente a Pcl2, ya que era la que presentaba mayor representación. Como control se utilizó a *cln2Δ* como el mayor representante del juego de ciclinas Cln's.

5.17.1 La ausencia de Pcl2 en YPD a 30°C no afecta a la progresión del ciclo celular

A modo de control se realizó un primer experimento en YPD a 30°C con la cepa salvaje, *pcl2Δ* y *cln2Δ*, en el que se observó el comportamiento de dichas cepas en estas condiciones.

La Figura 35A muestra que tras una liberación de α -factor la cepa *pcl2Δ* progresa igual que la salvaje, mientras que la cepa *cln2Δ* pasa a G2 10 min antes. El índice de gemación no muestra diferencias entre las cepas salvaje y *pcl2Δ*, mientras que *cln2Δ* presenta un índice más elevado, lo que se correlaciona con el adelanto en la progresión del ciclo con respecto a la salvaje (Figura 35B). Por otro lado, el tiempo de duplicación se mantiene igual en las 3 cepas (Figura 35C).

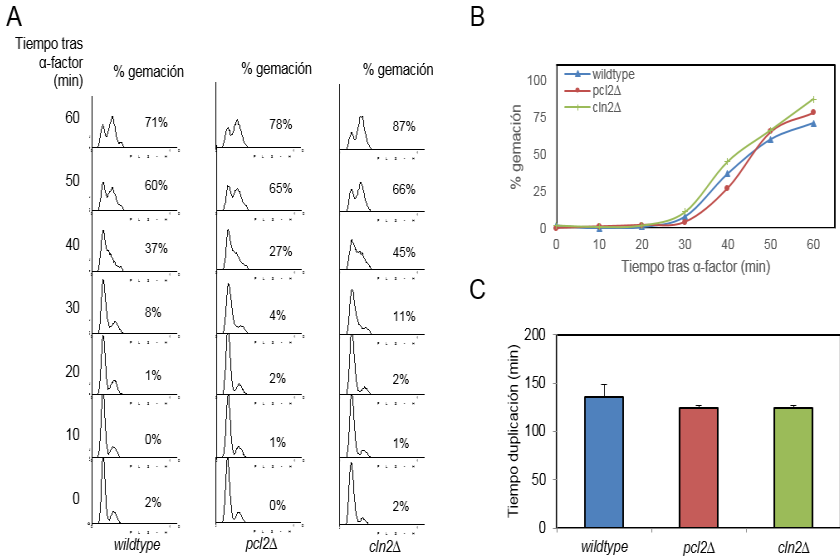


Figura 35. YPD 30°C (A) Progresión de las cepas *pci2Δ* y *cln2Δ*. Las células crecieron exponencialmente durante 3 horas a 30°C, se sincronizaron con α-factor durante 1:40h en y se resuspendieron en YPD a 30°C, tomando muestras a los tiempos indicados. **(B) Porcentaje de gemación.** El índice de gemación se obtuvo por microscopía. **(C) Tiempo de duplicación.** Las células crecieron exponencialmente en YPD a 27°C. Se muestra los datos ±SEM de 2 experimentos.

5.17.2 El índice de gemación se reduce en *pci2Δ* en YPD a 37°C

El análisis mediante FACS muestra que tanto *pci2Δ* como la cepa salvaje duplican su DNA del mismo modo, pero en lo que respecta a la gemación, se produce un claro retraso (Figura 36A). A partir del 30 min, *pci2Δ* muestra una disminución de la gemación de alrededor del 30% con respecto al salvaje (Figura 36B), lo que refuerza la idea de que bajo estrés térmico Pcl2 presenta alguna función que permite a la célula progresar adecuadamente. En cuanto a *cln2Δ* se mantiene el adelanto en la progresión del ciclo mostrado en YPD a 30°C (Figura 35A), mientras que el índice de gemación se ve reducido

alrededor de un 15% respecto al salvaje. Los tiempos de duplicación entre las diferentes cepas no muestran diferencias (Figura 36C), lo que indica que a pesar de que la gemación en una cepa *pcl2Δ* se ve retrasada, la célula es capaz de duplicarse con normalidad.

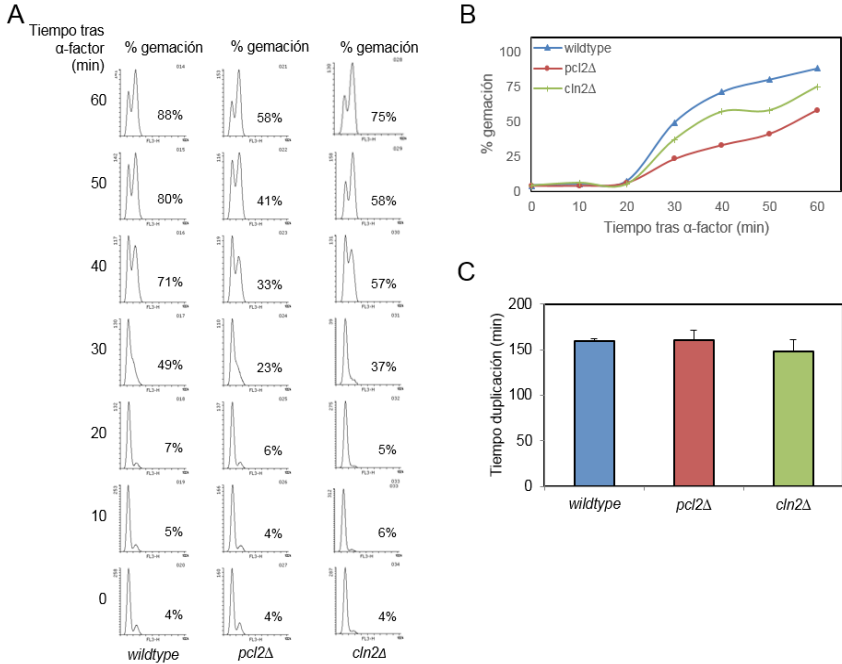


Figura 36. YPD 37°C (A) Progresión de las cepas *pcl2Δ* y *cln2Δ*. Las células crecieron exponencialmente durante 3 horas a 37°C, se sincronizaron con α -factor durante 1:40h y se resuspendieron en YPD atemperado a 37°C, tomando muestras a los tiempos indicados. **(B) Porcentaje de gemación.** El índice de gemación se obtuvo por microscopía. **(C) Tiempo de duplicación.** Las células crecieron exponencialmente en YPD a 27°C. Se muestra los datos \pm SEM de 2 experimentos.

5.17.3 En ausencia de Pcl2 la progresión del ciclo celular se ve retrasada en medio compuesto por malta con *heat shock* a 37°C

Una situación en la que se observaron mayores diferencias entre Pcl's y Cln's, fue cuando se crecieron las células en medio compuesto por malta y se las sometió a un *heat shock* a 37°C. Por lo que estas condiciones se seleccionaron para determinar el comportamiento en la progresión del ciclo celular mediante análisis por FACS de una cepa *pcl2Δ*.

La Figura 37 muestra que en este caso, la delección de Pcl2 causa un claro retraso en la progresión del ciclo, donde las células aún a 70 min tras la liberación de α -factor se encuentran en G1.

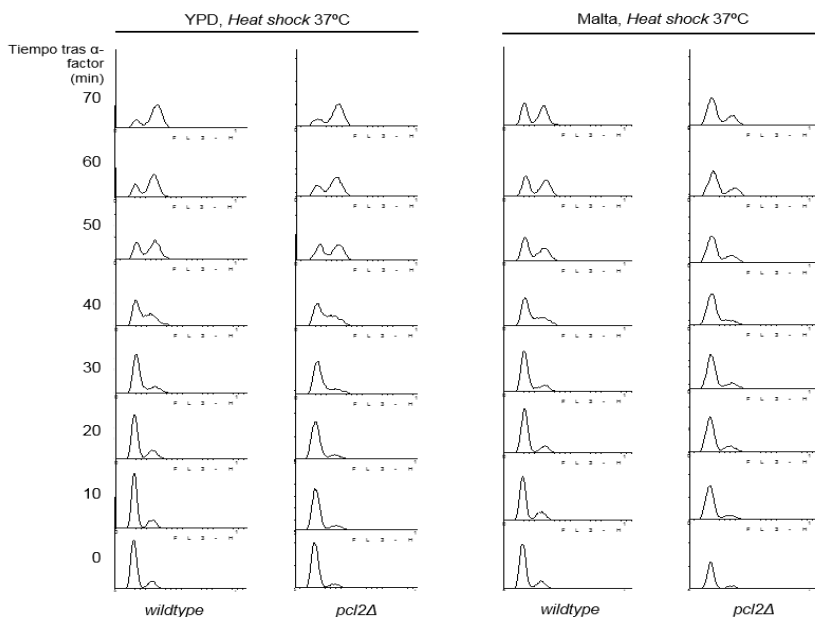


Figura 37. Progresión del ciclo celular en *pcl2Δ*. Las células crecieron exponencialmente durante 3 horas a 30°C en YPD o en medio compuesto por malta, se sincronizaron con α -factor durante 1:40h y se resuspendieron en YPD o malta atemperados a 37°C, tomando muestras a los tiempos indicados.

En ausencia de Pcl2, la levadura reduce su índice de gemación cuando se aplica estrés térmico independientemente del medio en el que se encuentre (YPD o malta). En el caso del medio YPD, tanto la cepa salvaje como *pcl2Δ* empiezan a gemar a partir de 30 min, quedando *pcl2Δ* a un índice menor que el salvaje y llegando hasta un 70% respecto al 88% de gemación que presenta el salvaje a 60 min. En el caso del medio compuesto por malta, las diferencias se acentúan, presentando unos niveles de gemación prácticamente estáticos en *pcl2Δ*, aumentando tan solo un 14% desde el punto inicial hasta los 60 min tras la liberación de α -factor, mientras que en la cepa salvaje a partir de 30 min empieza a aumentar el índice de gemación hasta un 29% a los 60 min. Lo que representa que en una cepa *pcl2Δ* que crece en un medio compuesto por malta, la gemación se ve reducida a la mitad con respecto a la cepa salvaje (Figura 38).

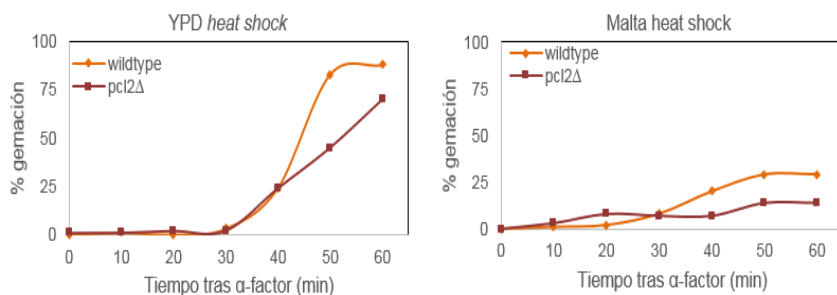


Figura 38. Índice de gemación de *pcl2Δ* bajo *heat shock* en YPD y en medio compuesto por malta. El índice de gemación se obtuvo por microscopía.

5.17.4 *pcl2Δ* no crece a 37°C en un fondo W303-1A

Debido a que las Pcl's presentan mayor cantidad bajo estrés térmico (Figura 14C, Figura 17C, Figura 24C, Figura 26C), se realizó un ensayo de crecimiento en dots (*spotting test*), en el que las ciclinas de G1 se deleccionaron individualmente y se hicieron crecer en YPD o en medio compuesto por malta a 30°C o 37°C. La Figura 39 muestra que en las

condiciones probadas no existen diferencias de crecimiento entre las diferentes cepas.

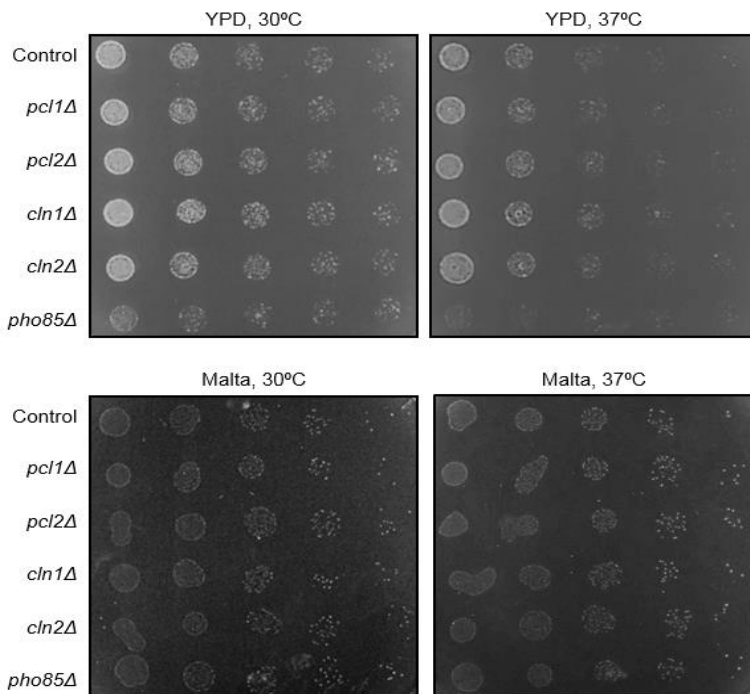


Figura 39. Crecimiento en dots en YPD y en medio compuesto por malta a 30°C y 37°C. Se realizaron diluciones seriadas de las cepas indicadas y se incubaron durante 2 días a 30°C o 37°C, tal y como se describe en materiales y métodos.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, en los que a 37°C el ciclo celular progresaba lentamente y el índice de gemación se reducía en una cepa *pcl2Δ* (Figura 37, Figura 38), el no observar diferencias de crecimiento en el *spotting test* resultó sorprendente. Por este motivo, se decidió realizar el mismo experimento utilizando diferentes fondos genéticos en los que se deletionó a *Pcl2*. En este caso, se observó que en un fondo W303-1A la

delección de *pcl2Δ* a una temperatura de 37°C no producía crecimiento (Figura 40).

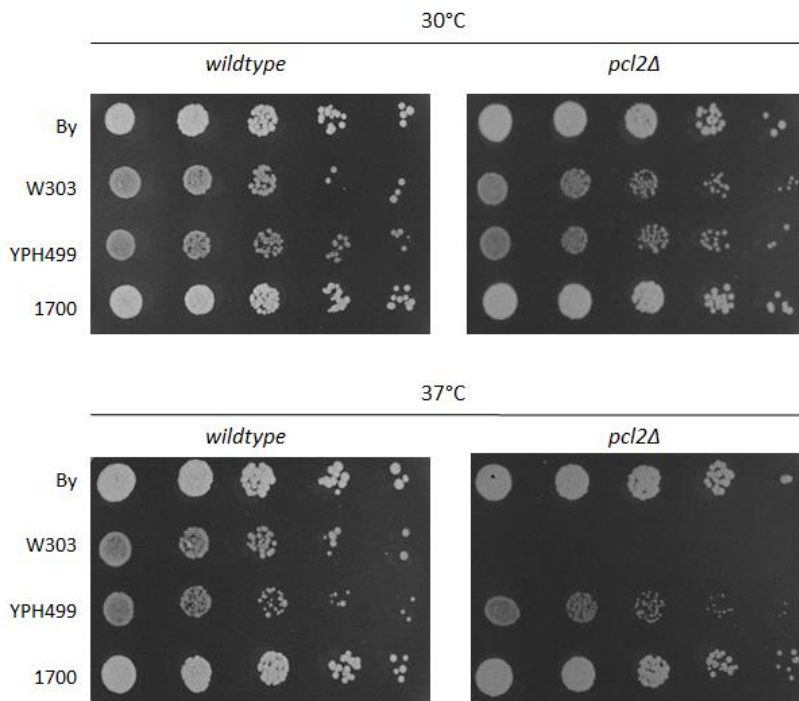


Figura 40. Ensayo de crecimiento en dots de *pcl2Δ* a 30°C y 37°C en diferentes fondos genéticos. Se realizaron diluciones seriadas de cada cepa y se incubaron durante 2 días a 30°C y 37°C, tal y como se describe en materiales y métodos.

Para descartar que el resultado no se tratara de un artefacto, se repitió el experimento utilizando tres transformantes distintos de W303 *pcl2Δ*. La Figura 41 confirma que a 37°C no hay crecimiento en un fondo genético W303-1A en el que Pcl2 ha sido deletado. Este resultado vuelve a sugerir que Pcl2 juega un papel en la adaptación a estrés térmico.

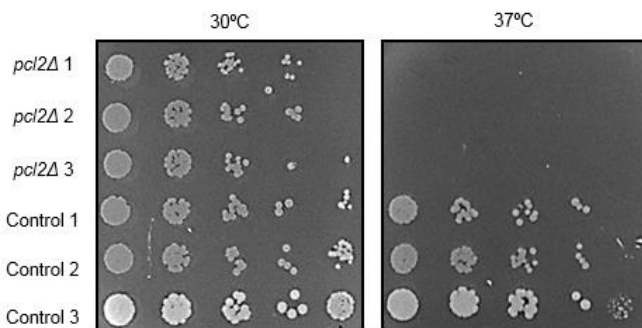


Figura 41. Ensayo de crecimiento en dots de *pcl2Δ* a 37°C en YPD. Se realizaron diluciones seriadas de cada cepa y se incubaron durante 2 días a 30°C y 37°C, tal y como se describe en materiales y métodos. Se muestran 3 cepas salvaje W303 y 3 cepas *pcl2Δ* independientes.

5.18 La colección de ciclinas, una herramienta versátil

La colección de ciclinas etiquetadas generada en este estudio se puede utilizar no sólo en experimentos de liberación de α -factor, sino que puede resultar de utilidad en otro tipo de experimentos que requieran la comparación de dichas ciclinas.

A modo de ejemplo, se muestra la Figura 42, en la que se ha utilizado estas ciclinas para observar su comportamiento bajo diferentes condiciones en las que se inflige daño al DNA (Tabla 5).

AGENTE	TIPO DE DAÑO
Metanosulfonato de metilo	Metila DNA, causa DSB's, para horquillas de replicación.
Camptotecina	Inhibe topoisomerasas
Cisplatina	<i>Crosslinking</i> con purinas del DNA
Hidroxiurea	Inhibición de la ribonucleótido reductasa

Tabla 5. Agentes mutagénicos empleados

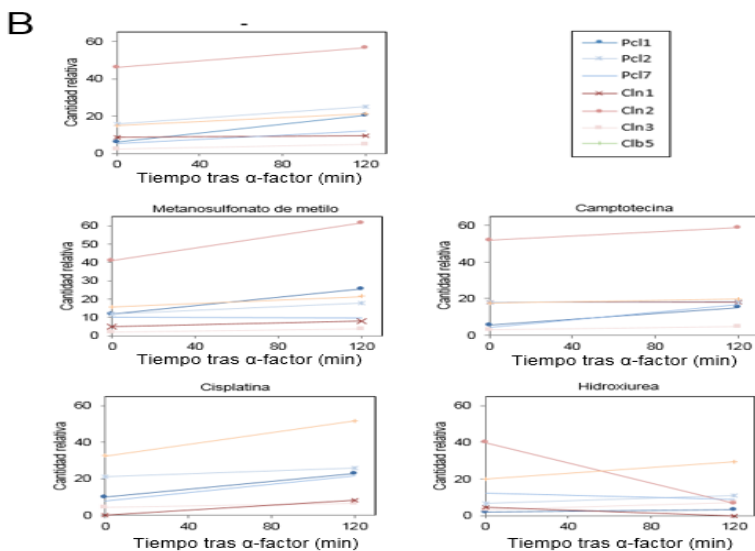
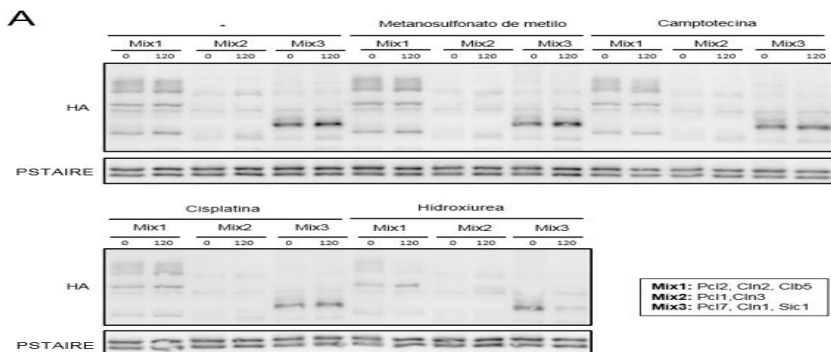


Figura 42. Comportamiento de las ciclinas bajo daño al DNA. (A) Las células crecieron toda la noche en YPD a 30°C, exponencialmente durante 3 horas y se añadió YPD fresco a 30°C suplementado con 0,033% metanosulfonato de metilo, 1 μ g/mL camptotecina, 600 μ M cisplatina o 192 mM hidroxiurea como agentes causantes de daño al DNA y se tomó muestra a tiempo 0 y 120 min. (B) Representación gráfica de A.

6. DISCUSIÓN

Metodología de trabajo utilizada

Analizar simultáneamente las distintas ciclinas ha resultado ser una metodología muy útil ya que ha permitido reducir el número de muestras de trabajo, lo que se traduce en un aumento en la facilidad de manipulación a nivel de trabajo de laboratorio y en una disminución del error introducido por el propio muestreo debido a la diferencia del tiempo transcurrido entre la primera muestra y la última. Por otro lado, también ha permitido una comparación de todas las ciclinas a la vez, evitando factores que podrían introducir error en el caso de analizarlas en geles distintos, como por ejemplo, las condiciones electroforéticas, de transferencia o de detección.

Todo esto, hace sugerir que la metodología utilizada para etiquetar las ciclinas del mismo modo y mezclando las distintas cepas en función del peso molecular de la proteína etiquetada, podría utilizarse como una herramienta versátil, trasladando esta metodología a otro tipo estudios que requieran la comparación de un gran número de proteínas.

Marcaje de las ciclinas

De entre todas las etiquetas probadas, la etiqueta seleccionada fue la 3HA. La detección de Pcl1 marcado con esta etiqueta, mostró el perfil cíclico característico de Pcl1 y no presentó bandas inespecíficas, sugiriendo que esta etiqueta no alteraba a la expresión, además de presentar una detección limpia.

Estudios posteriores al inicio de esta tesis, han dado lugar a avances en el marcaje de proteínas. Uno de estos avances se ha dado recientemente y corresponde al sistema CRISPR-Cas9 en *S. cerevisiae* (Ryan et al. 2016). Este sistema es capaz de introducir un DNA lineal en un lugar concreto del genoma, sin necesidad de marcador de selección y sin alterar el contexto genético. Para ello, realiza una transformación simultánea con el DNA lineal y

un plásmido, denominado pCAS, que contiene la secuencia de la caspasa-9 y un RNA guía que se unirá a la caspasa formando una ribonucleoproteína funcional, lo que producirá que la caspasa sea dirigida a un lugar concreto del genoma por el RNA guía, producirá un corte y el DNA lineal será introducido por recombinación homóloga a las secuencias flanqueantes donde se ha producido el corte (Ryan & Cate 2014). A pesar de ser una técnica fácil de utilizar, económica y que permite la edición del genoma de forma muy dirigida, también presenta el inconveniente de que es una técnica muy reciente, sobre todo, su uso en *S. cerevisiae*, por lo que su desarrollo se hace necesario, ya que se ha visto que los cortes realizados por la caspasa-9 se pueden dar en lugares que presentan cierta homología con la secuencia guía de RNA, lo que puede originar mutaciones no deseadas, en lugares no deseados, por lo que requerirán del análisis del genoma en busca de secuencias parecidas a las del RNA guía (Hsu et al. 2013; Peng et al. 2016), dificultando mucho la detección de estas mutaciones indeseadas.

Otro avance en este campo, es el desarrollo de pequeñas etiquetas obtenidas a partir de plantas, denominadas *Inntags* (Georgieva et al. 2015). Estas etiquetas no poseen estructura tridimensional, lo que ha permitido reducir el riesgo de producir interferencias funcionales, estructurales o incluso de localización celular. Estas etiquetas, en comparación a las etiquetas comúnmente utilizadas en el laboratorio, han demostrado mantener el tamaño celular crítico de una cepa salvaje cuando se ha etiquetado a Cdc28 y a Ydj1, mientras que en las otras etiquetas este tamaño ha aumentado (Georgieva et al. 2015). Este sistema es muy interesante ya que uno de los mayores problemas de etiquetar una proteína, como es el evitar impedimentos estructurales de la proteína con la etiqueta, lo que puede repercutir en su funcionalidad e interacción, se ha visto resuelto. A pesar de ser un sistema a tener en cuenta en futuros experimentos, el marcaje con 3HA utilizado en esta tesis, no ha supuesto diferencias entre las distintas cepas etiquetadas (Figura 11).

La modificación del 3'UTR altera la expresión génica

Desde hace unos años se conoce que una parte de los RNA's no codificantes (ncRNA) del genoma, en especial los situadas próximos a las regiones génicas que codifican para proteínas, juegan un papel en la regulación de la transcripción (Costa 2010; Rinn & Huarte 2011). Estudios independientes a esta tesis, han descrito la existencia de ncRNA en los promotores de *S. cerevisiae*, capaces de transcribirse y alterar la expresión tanto de genes colindantes como de genes más lejanos (Wei et al. 2011; Wu et al. 2012).

Teniendo en cuenta lo expuesto, al iniciar el proyecto, se sopesó la posibilidad de que estas regiones no codificantes que juegan un papel en la regulación de la expresión génica, también estuvieran presentes en la región 3'UTR. Esta hipótesis se confirmó al comparar la ciclina Pcl1 marcada sin alterar su contexto genético y marcada alterando el contexto 3'UTR (Figura 10). Por lo que se decidió marcar a las ciclinas de manera que la región 3'UTR quedara intacta. A pesar de ser un resultado muy interesante, entender el mecanismo tras este efecto no era el objetivo del proyecto. Aunque la base de datos *Saccharomyces* GENOME DATABASE muestra un elemento ARS (ARS1407) a unas 800pb *downstream* de la región codificante de Pcl1, y teniendo en cuenta que el momento de expresión de Pcl1 marcado manteniendo intacto el 3'UTR como alterándolo es el mismo, todo esto podría indicar que el desplazamiento producido de este elemento ARS a la hora de realizar el marcaje, pudiera estar afectando a la replicación de Pcl1, lo que se traduce en una alteración de su síntesis. Otra opción, sería que el 3'UTR contuviera elementos de unión a factores de transcripción, por lo que su alteración tendría implicaciones a nivel transcripcional, o lo que se encontrara alterado fuera la traducción proteica o incluso la degradación.

Estos resultados indican que los estudios realizados hasta ahora sobre la progresión del ciclo celular pueden estar influenciados por un artefacto. A modo de ejemplo, para saber el momento de entrada a fase S, es importante conocer los niveles de Clb5 y Sic1, si la expresión génica de ambos

se encuentra alterada por el proceso de marcaje, este punto de referencia se verá desplazado y esto creará discordancia entre diferentes laboratorios que utilicen diferentes marcajes.

Control del ciclo celular

El ciclo celular engloba toda una serie de procesos ordenados. El estudio de cómo la célula logra ordenar todos estos procesos, para dar lugar a la proliferación de células sanas, es un ámbito muy estudiado y que ha llevado al desarrollo de varias teorías. Teniendo en cuenta que una sola CDK, Cdc28, se encuentra regulando todas las fases del ciclo celular, una hipótesis es que la actividad del complejo CDK-ciclina varía a lo largo del ciclo. De manera que una actividad baja en fase S dará lugar a la fosforilación de unos sustratos, mientras que una actividad más elevada en fase M dará lugar a la fosforilación de otros sustratos, consiguiendo así ordenar los procesos pertinentes a la progresión del ciclo celular en el tiempo (Stern & Nurse 1996; Coudreuse & Nurse 2010; Swaffer et al. 2016). Otra hipótesis, añade otro nivel más de control de la correcta progresión del ciclo celular a la anterior. Este nivel adicional correspondería a la actividad fosfatasa, que actuaría contrarrestando la actividad CDK-ciclina, defosforilando los sustratos previamente fosforilados por los complejos CDK-ciclina y llevando a los sustratos al umbral de fosforilación correcto en cada fase del ciclo celular (Uhlmann et al. 2011). La tercera hipótesis, se basa en que el orden en la progresión del ciclo celular, es llevado a cabo por los mecanismos de control denominados *checkpoints*, que actuarían previniendo los acontecimientos tardíos del ciclo celular hasta que los acontecimientos tempranos no se hubieran llevado a cabo (Hartwell 1978; Hartwell & Weinert 1989). Finalmente la cuarta hipótesis, se basa en la presencia de diferentes ciclinas que producen ondas de expresión en puntos concretos del ciclo celular, y sugiere que en cada fase del ciclo celular distintos sustratos son fosforilados por los complejos CDK-ciclina, dotando a las ciclinas de cada fase de especificidad de sustrato (Surana et al. 1991).

Teniendo en cuenta que *S. cerevisiae* presenta dos CDK's que regulan la progresión del ciclo celular, que cada una se une a sus propias ciclinas y que la delección simultánea de las cuatro ciclinas de G1, resulta inviable, pero la delección de únicamente una de ellas no (Measday et al. 1994; Moffat & Andrews 2004); la hipótesis de trabajo en esta tesis se ha basado en que a pesar de existir cierta redundancia en las funciones realizadas por las diferentes familias de ciclinas de G1, Pcl1,2 y Cln1,2, estas dos familias deben realizar funciones específicas en determinadas condiciones ambientales o de estrés. Por lo que uno de los objetivos fue determinar situaciones en las que la expresión de los complejos Pho85-Pcl fuera más importante que la de los complejos Cdc28-Cln. Y tal y como se ha demostrado, existen situaciones, como estrés térmico, oxidativo o respuesta a nutrientes, en los que los niveles de Pcl's son mayores a los presentados por Cln's. Atendiendo al principio básico de economía celular, se puede suponer que la cantidad de proteína es proporcional a su actividad, por lo que en estas situaciones Pcl's presentarían mayor importancia que Cln's, sugiriendo que existen sustratos que son fosforilados, de manera específica o con más intensidad, por los complejos Pho85-Pcl en estas situaciones concretas.

Pcl2 en estrés térmico y oxidativo

La cuantificación de las ciclinas ha demostrado que en YPD a 30°C, Pcl's y Cln's se encuentran en la misma cantidad, lo que podría relacionarse con la redundancia de funciones llevada a cabo por ambas familias (Measday et al. 1994). Esta proporción se ha visto alterada en algunos casos, como por ejemplo cuando la levadura es sometida a estrés térmico u oxidativo, situaciones en las que la cantidad de Pcl's es superior a la de Cln's. No es de extrañar que en estas dos situaciones el comportamiento de la levadura sea parecido, ya que ambos estreses activan al mismo mecanismo de adaptación, denominado respuesta a *heat shock* (Morano et al. 2012). Concretamente, ambas situaciones inducen por un lado, la migración del factor de transcripción de respuesta a *heat shock* compuesto por Msn2 y Msn4 hacia el

núcleo, promoviendo su unión a los elementos de respuesta a estrés (STRE) y activando de este modo la transcripción de los genes de respuesta a estrés, y por otro lado, ambos activan al factor de transcripción Hsf1 que se unirá a los promotores de los genes que contengan *heat shock elements* (HSE), promoviendo su transcripción (Morano et al. 2012). Dado que la ciclina más abundante bajo estas condiciones es Pcl2, y su ausencia produce alteraciones importantes en el crecimiento de la levadura a 37°C (Figura 37 y Figura 41), y teniendo en cuenta que una cepa donde su CDK, Pho85, se ha deletado es termosensible (Ruiz-Roig et al. 2010), se deduce que Pcl2 presenta un papel importante, incluso esencial en el caso de W303, en la adaptación a estrés térmico. Estos resultados sugieren que: 1) Pcl2 podría presentar en su promotor STRE's o HSE's que regulen su expresión génica bajo estrés térmico, 2) Pcl2 podría estar regulando los factores de transcripción Msn2/Msn4 o Hsf1, o 3) Pcl2 podría estar regulando directamente a las proteínas de respuesta a estrés térmico. Teniendo en cuenta que Pcl2 es una proteína que presenta funciones reguladoras en la progresión del ciclo celular (Measday et al. 1997) y también en el crecimiento polarizado y la morfogénesis (Moffat & Andrews 2004), las dos últimas opciones propuestas, en las que se le atribuye un papel regulador más a Pcl2, serían las más factibles.

La función desempeñada por Pcl2 bajo estrés térmico, podría tener implicaciones más prácticas en microorganismos cercanos a *S. cerevisiae*, como es el caso de *Candida albicans*, hongo oportunista que causa enfermedad en humanos. La morfología de *C. albicans* está directamente relacionada con su patogénesis y esta depende exclusivamente de la temperatura a la que crece, presentando un crecimiento de levadura a 30°C y a partir de 37°C su crecimiento se torna filamentoso (Shapiro et al. 2012). *C. albicans* comparte muchas características con *S. cerevisiae* y se estima que presenta alrededor de 6107 genes de los cuales solamente 774 son específicos de *C. albicans* (Jones et al. 2004; Kabir et al. 2012). El crecimiento filamentoso de este hongo está relacionado con su patogenicidad, ya que este mecanismo le facilita la penetración en los epitelios, endotelios y tejidos humanos (Gow et al. 2002). Estudios realizados hasta el momento, han

mostrado que el crecimiento filamentoso es inhibido mediante farnesol, una molécula de autoinducción (o en inglés *quorum sensing*) excretada por *C. albicans* (Ramage et al. 2002; Enjalbert & Whiteway 2005). Curiosamente, el farnesol induce la expresión de Pcl2, lo que sugiere que Pcl2 podría presentar una función morfogénica relacionada con el crecimiento filamentoso. En *C. albicans* Pcl2 es la única ciclina de la familia de Pho85 que se encuentra regulada cíclicamente, presentando un pico de expresión en la transición G1-S (Enjalbert & Whiteway 2005). Sería interesante comprobar si la sobreexpresión de Pcl2 en *C. albicans* a 37°C, temperatura que promueve el crecimiento filamentoso y por lo tanto, su patogenicidad, revierte este fenotipo patogénico. Además, reforzando aún más la idea de que las Pcl's realizan funciones específicas a 37°C, también se ha demostrado en *C. albicans*, que Pcl1 es importante para el crecimiento filamentoso (Shapiro et al. 2012). Dado que en humanos no existen proteínas homólogas ni a Pcl1 ni a Pcl2, estas dos proteínas resultarían dianas interesantes para el desarrollo de fármacos que evitasen el crecimiento filamentoso en *C. albicans* a través de la acción sobre Pcl1 y/o Pcl2.

Pcl's en respuesta a la situación de nutrientes

El cambio de medio rico YPD a medio mínimo completo SD también ha ocasionado un aumento en la cantidad de Pcl's con respecto a Cln's. Este tipo de regulación ya fue descrita para Pcl1 por Hernández-Ortega et al en 2013, en el que se determinó que en respuesta a nutrientes hay un aumento de Pcl1 respecto a Cln2 debido a la presencia de dos mecanismos de degradación distintos para cada ciclina. En esta tesis, se ha confirmado ese aumento de Pcl1 y también se ha observado un aumento de Pcl7, por lo que en esta situación hay mayor representación de Pcl's que de Cln's.

La regulación de las ciclinas en respuesta a nutrientes es algo conocido; por ejemplo, Cln1 y Cln2 se acumulan de distinta forma si la levadura crece en medio con glucosa o si lo hace en rafinosa (Fey & Lanker

2007). O incluso el inicio del ciclo celular llevado a cabo por Cln3, puede verse retrasado en ausencia de fosfato por la represión de Pho85-Pho80 sobre Cln3 (Menoyo et al. 2013). También se ha observado que en ausencia de nitrógeno se induce Pcl2 y Cln3 es degradado, en un mecanismo llevado a cabo por el complejo Pho85-Pcl2 que activa a la chaperona Ssa1, haciendo que se una a Cln3 e induzca su degradación (Truman et al. 2012). Teniendo en cuenta, que a pesar de que tanto el medio completo YPD como el medio mínimo completo SD son medios ricos, existen diferencias entre los dos ya que el medio YPD contiene peptona, formada por péptidos y aminoácidos libres que actúan como fuente de nitrógeno, y *yeast extract*, del cual la composición exacta se desconoce pero se sabe que también contiene péptidos y aminoácidos libres, por lo cual se trata de otra fuente de nitrógeno. El medio mínimo completo en lugar de peptona y *yeast extract* como fuente de nitrógeno contiene *yeast nitrogen base*. El resto de componentes entre un medio de cultivo y otro son los mismos. Por lo cual, se intuye que la cantidad de nitrógeno entre en un medio y otro no es exactamente la misma y hace suponer que el aumento de Pcl's respecto Cln's cuando se da un cambio de medio de YPD a SD, podría ser debido en respuesta a la cantidad de nitrógeno.

Relevancia del estudio

Este estudio ha permitido generar una colección de ciclinas marcadas del mismo modo, que pueden resultar útiles en futuros estudios que precisen la comparación de estas ciclinas en otras condiciones distintas a las de esta tesis.

También se presenta la metodología utilizada para analizar las diferentes ciclinas en un mismo gel como una herramienta versátil, útil para todo tipo de proteínas, además de proporcionar las siguientes ventajas: 1) etiquetar todas las proteínas de estudio del mismo modo con una etiqueta limpia, 2) etiquetar las proteínas sin alterar el 3'UTR y sin alterar la expresión génica, 3) facilitar la manipulación de gran cantidad de proteínas a la vez y 4)

comparar todas las proteínas de estudio unas con otras, disminuyendo la variabilidad.

En cuanto a los estudios realizados hasta el momento sobre cómo se comportan las ciclinas a lo largo del ciclo, estos se han llevado a cabo analizando sus niveles de mRNA (Spellman et al. 1998), o solamente se han tenido en cuenta a las ciclinas de Cdc28 (Tyers et al. 1993). Estos estudios han aportado información sobre el momento de transcripción de las ciclinas para la principal CDK de *S. cerevisiae*, Cdc28, pero no han aportado información sobre la CDK Pho85. Tampoco han aportado información cuantitativa acerca de la cantidad de una ciclina respecto a otra. Por lo que la información de la que se dispone hace referencia a la presencia o ausencia de las ciclinas en términos cualitativos.

El estudio cuantitativo de las ciclinas de G1 utilizando la colección de ciclinas generada en este estudio, ha permitido obtener patrones de expresión de las ondas de ciclinas, tanto para Cdc28 como para Pho85, aportando nueva información acerca de la cantidad de cada ciclina y completando la ausencia de información sobre las ciclinas de Pho85.

Por otro lado, tanto los complejos Cdc28-Cln como Pho85-Pcl comparten diversos sustratos implicados en el control del ciclo celular. Pho85, a diferencia de Cdc28, no es una proteína esencial, de manera que Pho85 siempre ha sido etiquetada como una CDK accesoria y se ha sugerido que su función es meramente redundante. Esto hace cuestionarse por qué las células eucariotas disponen de más de una CDK para controlar su progresión por el ciclo celular y de más de una ciclina para controlar a cada CDK. Una posibilidad, es que para ganar en robustez la maquinaria del ciclo celular debe mostrar un alto grado de redundancia. Pero los resultados obtenidos en esta tesis, abren la puerta a una nueva posibilidad, indicando que la regulación del ciclo celular llevada a cabo por los dos complejos CDK-ciclina no se trata únicamente de un mecanismo redundante, sino que también resulta en un mecanismo específico ante determinadas situaciones, tales como estrés o disponibilidad de nutrientes.

En resumen, este estudio ha permitido obtener por primera vez el impacto relativo, en términos de cantidad, de las diferentes ciclinas de G1, tanto de Cdc28 como de Pho85. Sorprendentemente, asumiendo que la cantidad de ciclina es un reflejo de la actividad de su CDK, se han encontrado situaciones en las que los complejos Pho85-Pcl han presentado mayor importancia que los complejos Cdc28-Cln, indicando que Pho85, aparte de presentar funciones redundantes en el control del ciclo celular, en estas situaciones concretas podría realizar funciones específicas, fosforilando sustratos distintos a los de Cdc28, o incluso a los mismos, pero de distinta forma o produciendo un efecto biológico distinto.

Futuras perspectivas

A partir de los resultados obtenidos, se pueden desprender futuras investigaciones, como por ejemplo el estudio de cómo las Pcl's actúan ante estrés térmico y en respuesta a nutrientes, qué mecanismos regulan su síntesis en estas condiciones y a su vez a qué sustratos están regulando; o el estudio de cómo el 3'UTR regula la expresión génica para poder aplicarlo a situaciones donde la manipulación de la expresión de un gen sea importante, por ejemplo para el control de una enfermedad.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis han permitido obtener las siguientes conclusiones:

- La metodología de marcaje y cuantificación de múltiples ciclinas simultáneamente, puede ser utilizada como herramienta para simplificar estudios en los que se requiera comparar varias proteínas a la vez entre ellas, manteniendo intacto su contexto genético.
- La expresión de Pcl1 se encuentra regulada por su región 3'UTR.
- En condiciones normales de laboratorio, YPD o medio mínimo completo a 30°C, tanto Cln's como Pcl's se encuentran en cantidades similares.
- La cantidad de Pcl's aumenta con respecto a Cln's en respuesta a diferentes condiciones ambientales, como la composición del medio de cultivo, estrés térmico, estrés osmótico y estrés oxidativo.
- La cantidad de Pcl's disminuye con respecto a Cln's en respuesta a estrés reductivo.
- Pcl2 es necesario para la correcta progresión del ciclo celular a 37°C y para la adaptación a estrés térmico.

8. RESUMEN

Saccharomyces cerevisiae es un microorganismo unicelular eucariota que por presentar su genoma totalmente secuenciado, gran facilidad de manipulación en el trabajo de laboratorio y a que muchos de sus genes se encuentran conservados en organismos superiores como el humano (Dujon, 1996, Goffeau et al., 1996; Harashima et al. 2013), se presta como un modelo ideal para el estudio, en este caso, de la progresión del ciclo celular.

El ciclo celular de *S. cerevisiae* se encuentra regido por dos CDK's: la primera, Cdc28, es considerada esencial, mientras que la segunda, Pho85, se considerada una CDK redundante. Ambas CDK's son activadas por la unión a sus diferentes ciclinas, y estas son expresadas periódicamente, actuando en puntos concretos del ciclo celular, a excepción de Cln3 que se encuentra a lo largo de todo el ciclo (Lodish et al. 2000; Bouchoux & Uhlmann, 2011).

Los estudios realizados hasta el momento sobre el estudio del comportamiento de las ciclinas a lo largo del ciclo se han centrado únicamente en Cdc28, dejando un vacío sobre cómo se comportan las ciclinas de Pho85. Además, estos estudios se han realizado a nivel cualitativo, por lo que se desconoce la importancia de cada ciclina individualmente, ya que no permiten la comparación de una respecto a otra.

Los experimentos realizados en esta tesis han permitido obtener información cuantitativa, gracias a una metodología de trabajo que ha permitido etiquetar a todas las ciclinas de G1 del mismo modo y se han podido analizar todas ellas a la vez mediante *western blot*, permitiendo su cuantificación y comparación de todas con todas, tanto en condiciones normales de laboratorio como en condiciones de diferentes tipos de estrés.

Además, durante la puesta a punto de la metodología de marcaje de las ciclinas, se obtuvo de forma inesperada un primer resultado, que indicaba que la alteración de la región 3'UTR afectaba de algún modo, a la expresión génica. Por lo que se decidió seguir una estrategia de marcaje que respetara completamente al 3'UTR.

Por otro lado, los resultados obtenidos han demostrado que en condiciones normales de laboratorio, la proporción de Pcl's y Cln's es la misma. Asimismo, en condiciones de estrés térmico, la cantidad de Pcl's se encuentra muy por encima de la de Cln's. Y más aún, en estas condiciones de estrés térmico, la delección de Pcl2 provoca un retraso en la progresión del ciclo celular en un fondo BY4741 y la inviabilidad en un fondo W303. Estos resultados ponen de manifiesto que los complejos Pho85-Pcl presentan una función específica, en este caso frente a la adaptación a estrés térmico, y no solamente una función redundante como se le atribuía hasta el momento.

Los resultados obtenidos en esta tesis dejan la puerta abierta a futuras investigaciones sobre cómo Pcl2 actúa bajo estrés térmico, qué mecanismos de síntesis y degradación lo regulan y qué aplicaciones podría tener su manipulación en organismos patógenos como *C. albicans* para inhibir su patogenicidad, organismo que crece preferentemente a 37°C, y en el cual se ha observado que la presencia de Pcl2 evita el crecimiento filamentoso característico de su virulencia (Gow et al. 2002).

9. ABSTRACT

Cell cycle of eukaryotic cells is driven by the action of several CDK's proteins and a broad array of regulatory cyclins. To date, the knowledge accumulated on cyclins is based on qualitative studies performed by different labs around the world. Besides, these studies might be affected by artefacts intrinsic to the manipulation of the cell to be inspected. In this work, is presented a comprehensive study on the amount of all the G1 cyclins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* tagged in the most respectful way in order to be as closer as possible to undisturbed cells. It is provide with a temporal and quantitative blueprint of all G1 cyclins that permits to wonder about influence of the different cyclins, individually or grouped in families according to their favourite CDK, in the progression through the late G1 phase of the cell cycle both in normal lab conditions and upon an array of stress situations in which a yeast can be found.

REFERENCIAS

8. REFERENCIAS

- Bähler, J., 2005. Cell-Cycle Control of Gene Expression in Budding and Fission Yeast. *Annual Review of Genetics*, 39(1), pp.69–94.
- Barberis, M., 2012. Sic1 as a timer of Clb cyclin waves in the yeast cell cycle - design principle of not just an inhibitor. *FEBS Journal*, 279(18), pp.3386–3410.
- BARBERIS, M. et al., 2005. The yeast cyclin-dependent kinase inhibitor Sic1 and mammalian p27Kip1 are functional homologues with a structurally conserved inhibitory domain. *Biochemical Journal*, 387(3).
- Bellí, G. et al., 2001. Osmotic stress causes a G1 cell cycle delay and downregulation of Cln3/Cdc28 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 39(4), pp.1022–1035.
- Bertoli, C., Skotheim, J.M. & de Bruin, R.A.M., 2013. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(8), pp.518–28.
- Bloom, J. & Cross, F.R., 2007. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(2), pp.149–160.
- Boeke, J.D. et al., 1987. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in enzymology*, 154, pp.164–75.
- Bömeke, K. et al., 2006. Yeast Gcn4p stabilization is initiated by the dissociation of the nuclear Pho85p/Pcl5p complex. *Molecular biology of the cell*, 17(7), pp.2952–62.
- Bouchoux, C. & Uhlmann, F., 2011. A Quantitative Model for Ordered Cdk Substrate Dephosphorylation during Mitotic Exit. *Cell*, 147(4), pp.803–814.
- Brauer, M.J. et al., 2008. Coordination of growth rate, cell cycle, stress response,

- and metabolic activity in yeast. *Molecular biology of the cell*, 19(1), pp.352–67.
- Breeden, L.L., 2003. Periodic Transcription: A Cycle within a Cycle. *Current Biology*, 13(1), pp.R31–R38.
- Brion, C. et al., 2016. Differences in environmental stress response among yeasts is consistent with species-specific lifestyles. *Molecular biology of the cell*, 27(10), pp.1694–705.
- Broach, J.R., Pringle, J.R. & Jones, E.W., 1997. *Cell cycle and cell biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- de Bruin, R.A.M. et al., 2004. Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell*, 117(7), pp.887–98.
- Capece, A. et al., 2013. Indigenous yeast population from Georgian aged wines produced by traditional “Kakhetian” method. *Food Microbiology*, 36(2), pp.447–455.
- Carroll, A.S. & O’Shea, E.K., 2002. Pho85 and signaling environmental conditions. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(2), pp.87–93.
- Causton, H.C. et al., 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular biology of the cell*, 12(2), pp.323–37.
- Clotet, J. & Posas, F., 2007. Control of Cell Cycle in Response to Osmostress: Lessons from Yeast. In *Methods in enzymology*. pp. 63–76.
- Costa, F.F., 2010. Non-coding RNAs: Meet thy masters. *BioEssays*, 32(7), pp.599–608.
- Costanzo, M. et al., 2004. CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell*, 117(7), pp.899–913.
- Coudreuse, D. & Nurse, P., 2010. Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature*, 468(7327), pp.1074–1079.
- Crespo, J.L. & Hall, M.N., 2002. Elucidating TOR signaling and rapamycin action:

- lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 66(4), p.579–91, table of contents.
- Crowe, J.H., 2007. Trehalose As a “Chemical Chaperone.” In *Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks*. New York, NY: Springer New York, pp. 143–158.
- Deshaies, R.J. & Ferrell, J.E., 2001. Minireview Multisite Phosphorylation and the Countdown to S Phaseishes the ability of Cln-CDK-treated Sic1 to serve as a substrate for SCF Cdc4 , and mutants lacking four CDK sites (Sic1- Δ 4P) are no longer ubiquitinated by SCF Cdc4 or. *Cell*, 107, pp.819–822.
- Dujon, B., 1996. The yeast genome project: what did we learn? *Trends in Genetics*, 12(7), pp.263–270.
- Dungrawala, H. et al., 2012. Identification of new cell size control genes in *S. cerevisiae*. *Cell division*, 7(1), p.24.
- Enjalbert, B. & Whiteway, M., 2005. Release from Quorum-Sensing Molecules Triggers Hyphal Formation during *Candida albicans* Resumption of Growth. *Eukaryotic Cell*, 4(7), pp.1203–1210.
- Escoté, X. et al., 2004. Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nature cell biology*, 6(10), pp.997–1002.
- Espinoza, F. et al., 1994. Cell cycle control by a complex of the cyclin HCS26 (PCL1) and the kinase PHO85. *Science*, 266(5189), pp.1388–1391.
- Farrugia, G. & Balzan, R., 2012. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Frontiers in oncology*, 2, p.64.
- Fernandez-Sarabia, M.J. et al., 1992. SIT4 protein phosphatase is required for the normal accumulation of SWI4, CLN1, CLN2, and HCS26 RNAs during late G1. *Genes & Development*,

- 6(12a), pp.2417–2428.
- Fey, J.P. & Lanker, S., 2007. Delayed accumulation of the yeast G1 cyclins Cln1 and Cln2 and the F-box protein Grr1 in response to glucose. *Yeast*, 24(5), pp.419–429.
- Gallego, C. et al., 1997. The Cln3 cyclin is down-regulated by translational repression and degradation during the G1 arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast. *The EMBO journal*, 16(23), pp.7196–206.
- Gasch, A.P. et al., 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular biology of the cell*, 11(12), pp.4241–57.
- Georgieva, M. V et al., 2015. Inntags: small self-structured epitopes for innocuous protein tagging. *Nature Methods*, 12(10), pp.955–958.
- Goffeau, A. et al., 1996. Life with 6000 genes. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5287), pp.546, 563–7.
- Golias, C.H., Charalabopoulos, A. & Charalabopoulos, K., 2004. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *International journal of clinical practice*, 58(12), pp.1134–41.
- Gow, N.A., Brown, A.J. & Odds, F.C., 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. *Current Opinion in Microbiology*, 5(4), pp.366–371.
- Harashima, H., Dissmeyer, N. & Schnittger, A., 2013. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in Cell Biology*, 23(7), pp.345–356.
- Hartwell, L.H., 1978. Cell division from a genetic perspective. *The Journal of cell biology*, 77(3), pp.627–37.
- Hartwell, L.H. et al., 1973. Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of cdc Mutants. *Genetics*, 74(2), pp.267–86.
- Hartwell, L.H. & Weinert, T.A., 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4930),

pp.629–34.

Hernández-Ortega, S. et al., 2013. Defective in mitotic arrest 1 (Dma1) ubiquitin ligase controls G1 cyclin degradation. *The Journal of biological chemistry*, 288(7), pp.4704–14.

Hoffmann, C. et al., 2005. A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nature Methods*, 2(3), pp.171–176.

Hohmann, S., 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 66(2), pp.300–72.

Hsu, P.D. et al., 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 31(9), pp.827–832.

Huang, D. et al., 2009. Dual Regulation by Pairs of Cyclin-Dependent Protein Kinases and Histone Deacetylases Controls G1 Transcription in Budding Yeast M. Solomon, ed. *PLoS Biology*, 7(9),

p.e1000188.

Huang, D. et al., 1999. Mammalian Cdk5 is a functional homologue of the budding yeast Pho85 cyclin-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(25), pp.14445–50.

Jackson, L.P., Reed, S.I. & Haase, S.B., 2006. Distinct mechanisms control the stability of the related S-phase cyclins Clb5 and Clb6. *Molecular and cellular biology*, 26(6), pp.2456–66.

Jiménez, J. et al., 2015. Live fast, die soon: cell cycle progression and lifespan in yeast cells. *Microbial cell (Graz, Austria)*, 2(3), pp.62–67.

Johnston, G.C., Pringle, J.R. & Hartwell, L.H., 1977. Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Experimental cell research*, 105(1), pp.79–98.

Johnston, M. & Kim, J.-H., 2005. Glucose as a hormone:

- receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Society Transactions*, 33(1).
- Jones, T. et al., 2004. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(19), pp.7329–34.
- Kabir, M.A., Hussain, M.A. & Ahmad, Z., 2012. *Candida albicans* : A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. *ISRN Microbiology*, 2012, pp.1–15.
- Kim, I.-S., Sohn, H.-Y. & Jin, I., 2011. Adaptive stress response to menadione-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *The Journal of Microbiology*, 49(5), pp.816–823.
- Kim, J.-H. et al., 2013. The glucose signaling network in yeast. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(11), pp.5204–10.
- Kõivomägi, M. et al., 2011. Cascades of multisite phosphorylation control Sic1 destruction at the onset of S phase. *Nature*, 480(7375), pp.128–31.
- Küntzel, H., Schulz, A. & Ehbrecht, I.M., Cell cycle control and initiation of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biological chemistry*, 377(7–8), pp.481–7.
- Lee, M. et al., 2000. Regulation of the Pcl7-Pho85 cyclin-cdk complex by Pho81. *Molecular Microbiology*, 38(2), pp.411–422.
- Legras, J.-L., Erny, C. & Charpentier, C., 2014. Population structure and comparative genome hybridization of European flour yeast reveal a unique group of *Saccharomyces cerevisiae* strains with few gene duplications in their genome. *PLoS one*, 9(10), p.e108089.
- Li, X. & Cai, M., 1997. Inactivation of the cyclin-dependent kinase Cdc28 abrogates cell cycle arrest induced by DNA damage and disassembly of mitotic spindles in

- Saccharomyces cerevisiae. *Molecular and cellular biology*, 17(5), pp.2723–34.
- Liu, J. & Kipreos, E.T., 2000. Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa. *Molecular biology and evolution*, 17(7), pp.1061–74.
- Lodish, H. et al., 2000. Overview of the Cell Cycle and Its Control.
- Loewith, R. & Hall, M.N., 2011. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics*, 189(4), pp.1177–201.
- Lushchak, O. et al., 2017. The role of the TOR pathway in mediating the link between nutrition and longevity. *Mechanisms of Ageing and Development*.
- Malumbres, M., 2014. Cyclin-dependent kinases. *Genome biology*, 15(6), p.122.
- Matsumoto, Y. & Wickner, R.B., 1993. CLG1, a new cyclin-like gene of Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, 9(8), pp.929–931.
- McInerny, C.J. et al., 1997. A novel Mcm1-dependent element in the SWI4, CLN3, CDC6, and CDC47 promoters activates M/G1-specific transcription. *Genes & development*, 11(10), pp.1277–88.
- Measday, V. et al., 1997. A family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 17(3), pp.1212–1223.
- Measday, V. et al., 2000. Interactions between Pho85 cyclin-dependent kinase complexes and the Swi5 transcription factor in budding yeast. *Molecular microbiology*, 35(4), pp.825–34.
- Measday, V. et al., 1994. The PCL2 (ORFD)-PHO85 cyclin-dependent kinase complex: a cell cycle regulator in yeast. *Science*, 266(5189), pp.1391–1395.

- Mendenhall, M.D. & Hodge, A.E., 1998. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 62(4), pp.1191–243.
- Menoyo, S. et al., 2013. Phosphate-Activated Cyclin-Dependent Kinase Stabilizes G1 Cyclin To Trigger Cell Cycle Entry. *Molecular and Cellular Biology*, 33(7), pp.1273–1284.
- Miles, S. et al., 2016. Msa1 and Msa2 Modulate G1-Specific Transcription to Promote G1 Arrest and the Transition to Quiescence in Budding Yeast J. A. Benanti, ed. *PLOS Genetics*, 12(6), p.e1006088.
- Miller, M.E. et al., 2005. Identification of novel and conserved functional and structural elements of the G1 cyclin Cln3 important for interactions with the CDK Cdc28 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 22(13), pp.1021–1036.
- Moffat, J. & Andrews, B., 2004. Late-G1 cyclin-CDK activity is essential for control of cell morphogenesis in budding yeast. *Nature cell biology*, 6(1), pp.59–66.
- Morano, K.A., Grant, C.M. & Moye-Rowley, W.S., 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), pp.1157–95.
- Morgan, D.O., 1997. CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13(1), pp.261–291.
- Murray, A.W. et al., 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, 116(2), pp.221–34.
- de Nadal, E., Alepuz, P.M. & Posas, F., 2002. Dealing with osmostress through MAP kinase activation. *EMBO reports*, 3(8), pp.735–40.
- Nash, P. et al., 2001. Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA

- replication. *Nature*, 414(6863), pp.514–21.
- Nishizawa, M. et al., 1998. Phosphorylation of sic1, a cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor, by Cdk including Pho85 kinase is required for its prompt degradation. *Molecular biology of the cell*, 9(9), pp.2393–405.
- Nishizawa, M., Kanaya, Y. & Toh-e, A., 1999. Mouse Cyclin-dependent Kinase (Cdk) 5 Is a Functional Homologue of a Yeast Cdk, Pho85 Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(48), pp.33859–33862.
- Otterstedt, K. et al., 2004. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO reports*, 5(5), pp.532–7.
- Peng, R., Lin, G. & Li, J., 2016. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS Journal*, 283(7), pp.1218–1231.
- Quilis, I. & Igual, J.C., 2012. Molecular basis of the functional distinction between Cln1 and Cln2 cyclins. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(16), pp.3117–31.
- Ramage, G. et al., 2002. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and environmental microbiology*, 68(11), pp.5459–63.
- Richardson, H. et al., 1992. Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2. *Genes & Development*, 6(11), pp.2021–2034.
- Rinn, J.L. & Huarte, M., 2011. To repress or not to repress: This is the guardian's question. *Trends in Cell Biology*, 21(6), pp.344–353.
- Roberts, C.J., 2000. Signaling and Circuitry of Multiple MAPK Pathways Revealed by a Matrix of Global Gene Expression Profiles. *Science*, 287(5454), pp.873–880.
- Roberts, J.M., 1999. Evolving ideas about cyclins. *Cell*, 98(2),

- pp.129–32.
- Rodrigues-Pousada, C.A. et al., 2004. Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS Letters*, 567(1), pp.80–85.
- Rossi, R.L. et al., 2005. Subcellular Localization of the Cyclin Dependent Kinase Inhibitor Sic1 is Modulated by the Carbon Source in Budding Yeast. *Cell Cycle*, 4(12), pp.1798–1807.
- Rothstein, R.J., 1983. One-step gene disruption in yeast. *Methods in enzymology*, 101, pp.202–11.
- Ruiz-Roig, C. et al., 2010. The Rpd3L HDAC complex is essential for the heat stress response in yeast. *Molecular Microbiology*, 76(4), pp.1049–1062.
- Ryan, O.W. & Cate, J.H.D., 2014. Multiplex Engineering of Industrial Yeast Genomes Using CRISPRm. In *Methods in enzymology*. pp. 473–489.
- Ryan, O.W., Poddar, S. & Cate, J.H.D., 2016. CRISPR–Cas9 Genome Engineering in *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(6), p.pdb.prot086827.
- Santangelo, G.M., 2006. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews*: *MMBR*, 70(1), pp.253–82.
- Secco, D. et al., 2012. Phosphate homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the key role of the SPX domain-containing proteins. *FEBS Letters*, 586(4), pp.289–295.
- Shapiro, R.S. et al., 2012. Pho85, Pcl1, and Hms1 Signaling Governs *Candida albicans* Morphogenesis Induced by High Temperature or Hsp90 Compromise. *Current Biology*, 22(6), pp.461–470.
- Shimoda, C., 2003. Forespore membrane assembly in yeast: coordinating SPBs and membrane trafficking. *Journal of Cell Science*, 117(3), pp.389–396.
- Simon, I. et al., 2001. Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle. *Cell*, 106(6), pp.697–

- 708.
- Spellman, P.T. et al., 1998. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Molecular biology of the cell*, 9(12), pp.3273–97.
- Stern, B. & Nurse, P., 1996. A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends in genetics : TIG*, 12(9), pp.345–50.
- Storici, F., Lewis, L.K. & Resnick, M.A., 2001. In vivo site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nature Biotechnology*, 19(8), pp.773–776.
- Surana, U. et al., 1991. The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell*, 65(1), pp.145–61.
- Swaffer, M.P. et al., 2016. CDK Substrate Phosphorylation and Ordering the Cell Cycle. *Cell*, 167(7), p.1750–1761.e16.
- Tennyson, C.N., Lee, J. & Andrews, B.J., 1998. A role for the Pcl9-Pho85 cyclin-cdk complex at the M/G1 boundary in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 28(1), pp.69–79.
- Tomar, P. & Sinha, H., Conservation of PHO pathway in ascomycetes and the role of Pho84.
- Trotter, E.W. & Grant, C.M., 2002. Thioredoxins are required for protection against a reductive stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 46(3), pp.869–878.
- Truman, A.W. et al., 2012. CDK-dependent Hsp70 Phosphorylation controls G1 cyclin abundance and cell-cycle progression. *Cell*, 151(6), pp.1308–18.
- Tyers, M., Tokiwa, G. & Futcher, B., 1993. Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *The EMBO journal*, 12(5), pp.1955–68.

- Uhlmann, F., Bouchoux, C. & López-Avilés, S., 2011. A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: revisited. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 366(1584).
- Vergheze, J. et al., 2012. Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), pp.115–158.
- De Virgilio, C., 2012. The essence of yeast quiescence. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), pp.306–339.
- De Virgilio, C. & Loewith, R., 2006. The TOR signalling network from yeast to man. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(9), pp.1476–1481.
- Wang, H. et al., 2009. Recruitment of Cln3 cyclin to promoters controls cell cycle entry via histone deacetylase and other targets. *PLoS biology*, 7(9), p.e1000189.
- Wang, Z. et al., 2001. The yeast cyclins Pc16p and Pc17p are involved in the control of glycogen storage by the cyclin-dependent protein kinase Pho85p. *FEBS Letters*, 506(3), pp.277–280.
- Wei, W. et al., 2011. Functional consequences of bidirectional promoters. *Trends in genetics: TIG*, 27(7), pp.267–76.
- Wittenberg, C. & Reed, S.I., 2005. Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene*, 24(17), pp.2746–2755.
- Wu, J., Delneri, D. & O’Keefe, R.T., 2012. Non-coding RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*: what is the function? *Biochemical Society transactions*, 40(4), pp.907–11.
- Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M.N., 2006. TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell*, 124(3),

pp.471–484.

Wysocki, R. et al., 2006. CDK Pho85 targets CDK inhibitor Sic1 to relieve yeast G1 checkpoint arrest after DNA damage. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(10), pp.908–914.

Yamamoto, N. et al., 2008. Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors

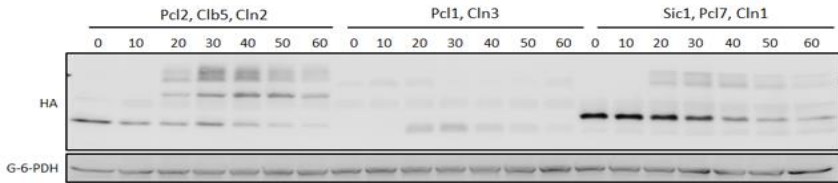
in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell*, 7(5), pp.783–90.

Yang, Z. et al., 2010. Positive or Negative Roles of Different Cyclin-Dependent Kinase Pho85-Cyclin Complexes Orchestrate Induction of Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, 38(2), pp.250–264.

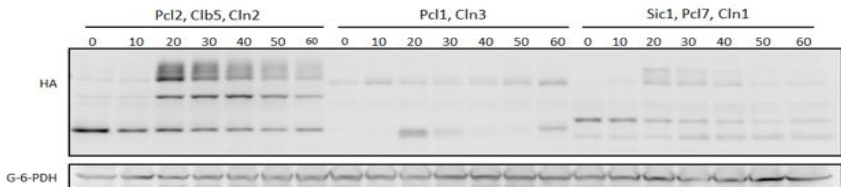
9. ANEXOS

9.1 Imágenes representativas de western blot

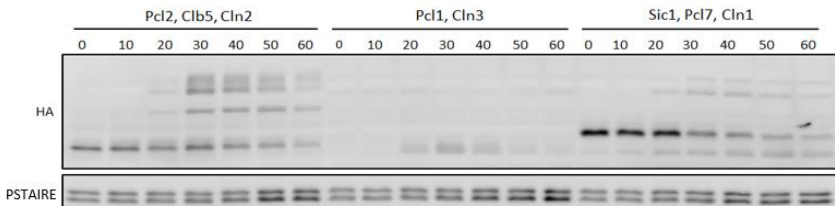
YPD 30°C



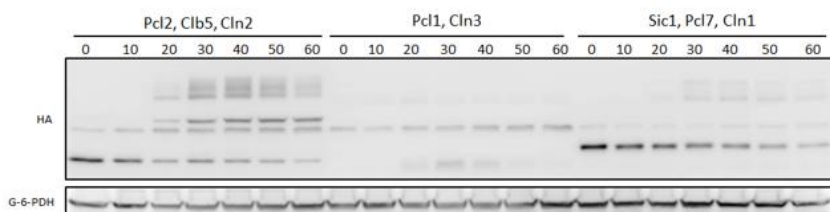
YPD 37°C



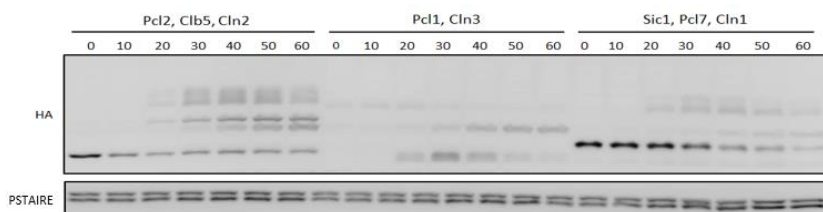
YPD *Heat Shock*, 37°C



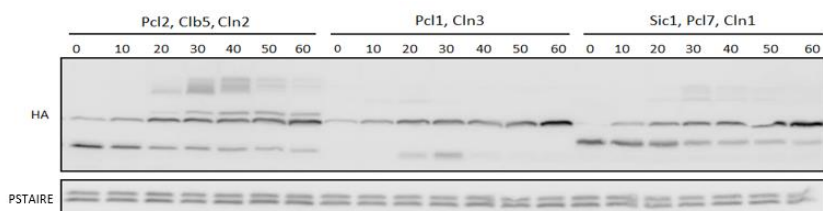
SD 30°C



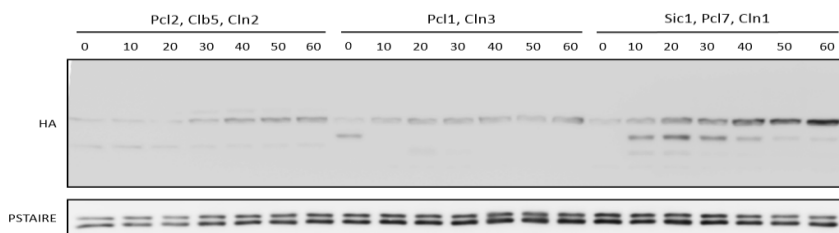
YPD a SD, 30°C



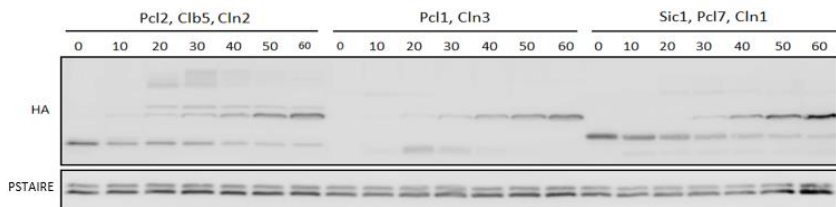
Malta 30°C



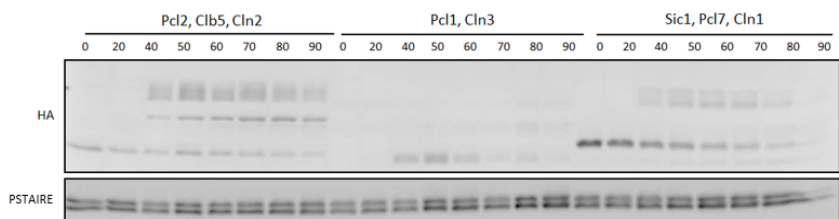
Malta 37°C



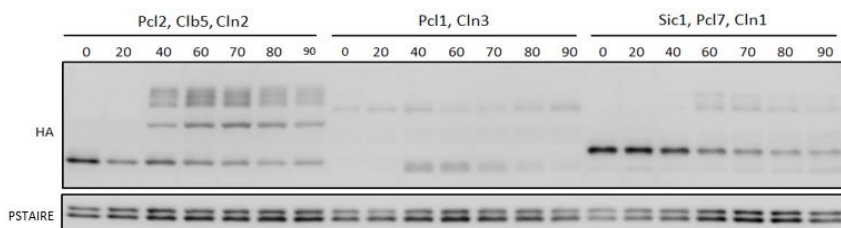
Malta Heat Shock, 37°C



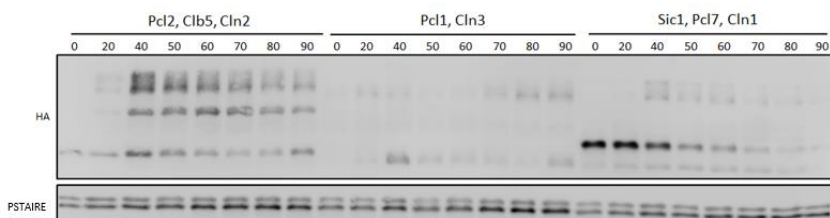
Estrés osmótico



Estrés oxidativo



Estrés reductivo



9.2 Comparación de las ciclinas bajo todas las condiciones de estudio

