



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Tamaño crítico: efectos e implicaciones en crecimiento y ciclo celular

Pedro Jesús Vidal Miñano



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

Programa de Doctorado en Biomedicina

Tamaño crítico: efectos e implicaciones en crecimiento y ciclo celular

Pedro Jesús Vidal Miñano

2020

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

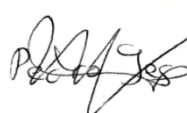
**Tamaño crítico: efectos e implicaciones en
crecimiento y ciclo celular**

Memòria presentada per Pedro Jesús Vidal Miñano per optar al títol de doctor per la
universitat de Barcelona

Martí Aldea Malo (Director)



Pedro Jesús Vidal Miñano (Doctorando)



Neus Agell Jané (Tutora)



En Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC)

Pedro Jesús Vidal Miñano

2020

Resumen

En la levadura de gemación el tamaño celular en START o tamaño crítico está determinado por la velocidad de crecimiento en G1. Durante esta fase, *Saccharomyces cerevisiae* presenta una disminución de la relación área superficie/volumen con el tamaño. En cambio, en el momento de la gemación se observa la existencia de un pico máximo en la velocidad de síntesis de la superficie celular, necesitando un gran aumento en la síntesis de materiales de la membrana plasmática y la pared celular, y un óptimo transporte de esos componentes hacia la yema, para el correcto crecimiento de ésta.

Por todo ello, postulamos la hipótesis de que la determinación del tamaño celular en START tendría importantes implicaciones en el óptimo crecimiento y desarrollo de la yema en las fases S-G2 del ciclo celular de levaduras. Para comprobar esta idea, realizamos un cuidadoso estudio del crecimiento en S-G2 y observamos que la velocidad de crecimiento de la yema no aumenta de manera proporcional al tamaño de la célula madre, especialmente a volúmenes muy grandes. Ello no sucedía durante G1, donde observamos que la velocidad de crecimiento es proporcional al tamaño celular, según las leyes del crecimiento exponencial. De modo muy notable, dicho efecto tampoco fue observado en células diploides y tetraploides, donde el tamaño es progresivamente mayor, pero proporcional al DNA genómico. Estos datos sugerían que la baja eficiencia de crecimiento de las células madre haploides de gran tamaño podría ser causada por algún tipo de insuficiencia génica. Por ejemplo, si la expresión de algunos genes importantes en crecimiento no escalase con el tamaño, se producirían cantidades limitantes de las proteínas codificadas y, por tanto, la eficiencia de los procesos correspondientes se vería seriamente comprometida.

El crecimiento de la yema depende del transporte de vesículas desde la célula madre, y observamos que dicho transporte no aumentaba proporcionalmente al volumen de la célula madre. Sin embargo, el transportador de vesículas Myo2 no mostró una expresión disminuida y tampoco observamos una deficiencia en el número de cables de actina en células grandes, indicando que el sistema de transporte en sí no era limitante. Por dichas razones concluimos que el problema podría residir en el contenido de las vesículas, el cargo. Por tanto, estudiamos proteínas representativas del crecimiento en G1/S, y descubrimos que su nivel disminuye con el tamaño. Como pieza central de este trabajo, comparamos los transcriptomas de células pequeñas y grandes en G1/S, y encontramos muchos genes de categorías funcionales específicas que se regulan al alza o a la baja en células grandes en comparación con células pequeñas. Entre ellos encontramos genes relacionados con el crecimiento apical, el transporte de vesículas, el citoesqueleto, y la biogénesis ribosómica, que representa un costo energético extraordinario y debe estar muy bien regulada para un crecimiento óptimo. Finalmente, para genes paradigmáticos en estas categorías, realizamos un análisis cuidadoso de la insuficiencia génica y confirmamos sus efectos limitantes sobre el crecimiento de la yema.

En resumen, nuestros resultados demuestran que *S. cerevisiae* ha establecido un tamaño crítico para lograr el crecimiento óptimo de la yema. A tamaños inusualmente mayores, la expresión de genes relacionados con proteínas ribosómicas, así como componentes esenciales del crecimiento apical, se reduce claramente produciendo una seria limitación del crecimiento celular.

Abstract

In budding yeast, cell size at START or the critical size is determined by the growth rate in G1. During this phase, *Saccharomyces cerevisiae* shows a decrease in the surface area/volume ratio as it increases in size. When the cell shifts from isotropic growth during G1 to polarized growth from the mother cell to the bud, surface synthesis rate peaks right after budding, where a great increase in plasma membrane and cell wall synthesis, and an optimal transport of these components to the bud, is necessary to grow as efficiently as possible.

Therefore, we hypothesized that cell size set at START would have important implications for the optimal growth and development of the bud in the S-G2 phases of the yeast cell cycle. To test this notion, we carefully analyzed growth kinetics in S-G2 phases and observed that the growth rate of the bud does not increase proportionally to the mother cell size, particularly at very large cell volumes. This effect did not take place during G1, where we found that growth rate is proportional to cell size, exquisitely following the rules of exponential growth. Notably, the abovementioned effect was not observed either in diploid or tetraploid cells where mother cell size is progressively larger, but proportional to genomic DNA. These data suggested that low growing efficiencies of large haploid mother cells could be caused by some sort of gene insufficiency. For instance, if expression of some genes playing prominent roles in bud growth would not scale with size, rate-limiting amounts of the encoded proteins would be produced and, hence, the efficiency of the corresponding processes would be seriously compromised.

One of the most important mechanisms for bud growth is the transport of vesicles from the mother cell. Indeed, we observed problems in transport, because it did not occur at a rate proportional to mother cell volume. However, it was not a matter of the transport machinery itself, since the Myo2 vesicle transporter did not show a decreased expression. Moreover, we did not observe either a deficiency in the number of actin cables at large cell volumes, indicating that the actin-based transport system was not limiting. For all these reasons, we concluded that the problem could reside in the vesicle contents, the cargo. Therefore, we studied representative proteins needed for active growth in the G1/S transition and found that their cell concentration was reduced at large volumes. As a central set of experiments of this work, we compared the transcriptomes of small and large cells while performing the G1/S transition, and found many genes belonging to specific functional categories that were upregulated or downregulated in large cells compared to small cells. Among those we found genes related to apical growth, vesicle transport, cytoskeleton, but especially to ribosomal biogenesis, which represents an extraordinary energetic cost, and must be extremely well regulated for optimal growth. Finally, for paradigmatic genes in these categories, we performed a careful analysis of gene insufficiency and confirmed their limiting effects on bud growth.

In all, our results demonstrate that *S. cerevisiae* has established a critical size to achieve an optimal bud growth. At unusually larger sizes, the expression of ribosomal protein-related genes, as well as essential components for apical growth, is clearly reduced and, as a consequence, results in serious cell growth limitation.

A mi familia

Agradecimientos

Por fin llegó el día del depósito de la TESIS. Y como es propio de mí, aunque no esté orgulloso de ello, “hasta el último día”. Han sido unos años muy alegres y de muchos cambios en mi vida, pues he cambiado de ciudad, de Comunidad Autónoma, de trabajo, ...de vida en general, aunque yo sigo siento el mismo, solo que un poco más maduro (creo). Pero también han sido unos años duros, difíciles, lejos de tu ciudad natal, trabajando hasta altas horas de la noche e incluso muchos fines de semana. Muchos.

Por todo ello, quisiera dar las gracias a todos aquellos que han formado parte de mi vida en estos último 5 años:

Algunos dicen que hay que dejar para el último momento los agradecimientos más importantes. Pero yo no lo quiero hacer así. Quisiera empezar dando las gracias a mi familia, pero en especial a la persona que más me ha ayudado en todos estos momentos difíciles. Y no solo por ello, sino por todo, por todo lo demás, es la persona que más quiero en mi vida. Mi pareja, Mercè. Mil gracias. Sin ti, todo esto no hubiera sido posible. Sin ti, esto no tendría sentido. T´estimo molt. Haremos todo lo que queramos, y lo haremos juntos.

Por otro lado, un apoyo muy importante ha sido el de mi familia, el de mi Little Family. Muchas gracias a mis padres Juana Mari y Pedro, a mi hermana Juani y a mi cuñado Fabio, y a mi sobrinilla “Auroreta”, porque también ella ha hecho mucho por mí, aunque no lo sepa ella, pero yo si lo sé. Gracias por quererme tanto desde la distancia. Siempre estaremos cerca. Os quiero.

Gente de mi laboratorio, gracias a todos. Todos han sido geniales, unos han sido compañeros de trabajo, pero para mí todos han sido amigos. Gracias a todos, a David por ser mi primer maestro desde que llegué, junto a Galal. A Eva y a Joan Marc, el resto del equipo de levadura. Y al nuevo miembro, Alexis. Eres muy grande. Y aunque no formen parte del grupo de investigación, pero sí del laboratorio, por lo que todos somos una familia. Gracias Raül y Sara, por hacer tan buen equipo juntos. Gracias al nuevo equipo de neuro, Marcos y Mónica. No sois los nuevos Raül y Sara, sois vosotros mismos. Sois geniales. Y a Miren, por ser la alegría de la huerta, y del laboratorio. No importa si llueve o truena, hay que sonreír a la vida y a los compañeros. Esa es la lección que me dejás.

Una mención a todas aquellas personas que han pasado por el laboratorio a aprender, pero que nos habéis dado la oportunidad de enseñar: Alex, Víctor, Raquel, María y Pol, y a todos los demás de TFG, TFM, ...habéis sido muchos, y mi cabeza es muy mala con los nombres. Y también a las nuevas incorporaciones como Marta y Blanca, aunque he tenido poco tiempo para conocerlos.

Gracias a mi jefe, Martí Aldea. Ha sido el mejor jefe que he tenido nunca. Siempre está ahí. Ama la ciencia. Y me ha dado un apoyo incondicional con mi tesis. Siempre, durante estos 5 años, pero sobre todo en estas últimas semanas. Su ayuda a sido crucial. Ha sido muy buen director de tesis, con ideas disruptivas, y mucha imaginación, pero sobre todo con mucho trabajo. Ha sido un buen compañero, y ha sabido animarme, aconsejarme y alegrar el día en los momentos que más lo necesita uno. Y a Carme, tú también has sido mi segunda jefa. Y de ti he aprendido a que se puede trabajar duro, pero también sonreír. Y al final se consiguen las cosas.

A mis amigos de Barcelona, que habéis sido unos muy buenos fichajes. Desde el principio que me acogieron Carlos, ese murciano que está descubriendo a Suiza, y a Serena, por sus risas. Gracias por darme asilo en las primeras semanas/meses. Siempre son las más difíciles. A ese músico Héctor. Contigo he sido *gruppie* por primera vez. Y a mis compañeros de fatigas, de risas, amigos para siempre: Pablo, mi maestro de escalada, contigo he tenido muy buenos momentos, pero te has ido a casa. Espero que vuelvas. Y Adrian, eres una persona maravillosa, un gran amigo, y sé que puedo contar contigo para lo que sea. Tú también conmigo. Abrazos a todos. A todos los que he estado con ellos en Barcelona, una ciudad especial.

Y por último a aquellos amigos que, aunque ahora apenas los veo por la distancia, pero que los llevo en el corazón. Amigos de Murcia, aunque viajen y se muevan por el Mundo. Miguelin, mi amigo del alma, eres todo amor, contigo puedo hablar de la vida y de ciencia. Y mi amigo Collado, que lo he hecho mucho de menos. A mi Familia de la cuesta, mis amigos de Molina. Pero sobre todo a esa pequeña piña que hicimos entre Andrea, Alberto, Jorge mi querido amigo desde la infancia y por siempre, y a mis dos queridos amigos, Armando y Mario. Creo que por mí lo dais todo, y yo por vosotros también. Aunque estemos temporadas sin hablar, pero yo sé que nos queremos. A Lorena, mi excuñá favorita, que al final hemos acabado en la misma ciudad. Sigue siempre con esa sonrisa por la vida y por los que quieres. Y a ese Peco, grande de corazón y grande como el que más, que junto a Pitu, me dejasteis participar en la creación de aquel singular proyecto/empresa. Todos aprendimos mucho en aquellos tiempos. Besos y abrazos!!!

A esos grupos de amigos que, aunque estamos desperdigados todavía hablamos y no perdemos el contacto: Murciando (Miguelin, con Guillo, Dona, Toni, ...), mis compañeros de la Universidad de Murcia, de química y bioquímica (sois muchos, pero os quiero a tod@ss).

A mi familia de Molina de Segura por parte de mi padre, y a los de Blanca y Abarán por parte de mi madre. Sois queridos, siempre. A mis padrinos, que los quiero enormemente.

Y es posible que me deje a gente, pero os quiero a todos y a todas. A unos os veo más y a otros menos. Pero tod@s habéis dejado huella en mí.

Índice

I. Introducción	1
1. Levaduras de gemación (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	3
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de división asimétrico.....	4
2. El ciclo celular en células eucariotas	5
2.1. Control en la progresión a través del ciclo celular por complejos CDK-Ciclina	7
2.2. CDC28: la principal CDK del ciclo celular y sus ciclinas	9
3. Entrada y ejecución de START	10
3.1. Regulón G1/S.....	11
4. Regulación del tamaño celular	12
4.1. Regulación del Volumen celular en <i>S. cerevisiae</i>	13
4.2. Tamaño celular y ploidía	15
5. Crecimiento en superficie y volumen en levaduras de gemación	17
5.1. Una antigua teoría: La relación Área superficial/Volumen celular como causante de la división de las células.....	17
5.2. Relación entre tamaño celular y velocidad de crecimiento.....	17
5.3. Necesidades para el crecimiento de la yema en levaduras (fases S-G2).....	18
II. Objetivos	21
III. Metodología	25
1. Condiciones de cultivo y Medios	27
2. Construcción de cepas de levadura.....	28
2.1. Cepas previamente construidas.....	28
2.2. Obtención de casetes de modificación genética	28
2.3. Transformación de levaduras.....	29
2.4. PCR de colonia.....	29
2.5. Extracción rápida de DNA genómico de levadura.....	30
3. Construcción de plásmidos y clonaje de genes	31
3.1. Clonación de genes y vectores receptores	31
3.2. Construcción por recombinación homologa.....	31
3.3. Transformación en células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	31
3.4. Extracción rápida de plásmidos para su comprobación (<i>Jet Preps</i>).....	32
3.5. Extracción de plásmidos para su utilización (<i>Mini Preps</i>).....	32
3.6. Obtención de DNA plasmídico a partir de levadura (<i>Zymoprep</i>).....	33
4. Técnicas de Microscopia <i>in vivo</i>	33

4.1.	Enriquecimiento de células de primer ciclo (gradientes de Ficoll).....	33
4.2.	Preparado y fijado de las células	34
4.3.	Obtención y análisis de imágenes por microscopía	34
4.4.	Determinación del volumen de gemación de levaduras en cultivos exponenciales	34
4.5.	Medida de competición celular (<i>fitness</i>)	35
4.6.	Microscopia multiposición time-lapse.....	35
4.7.	Determinación de la velocidad de crecimiento de las levaduras de gemación	36
4.8.	Velocidad de transporte de vesículas desde la célula madre hasta la yema	36
4.9.	Cuantificación del número de cables de actina.....	37
4.10.	Determinación de la concentración y localización de proteínas	37
5.	Análisis de RNAseq.....	38
5.1.	Extracción de RNA.....	38
5.2.	Secuenciación y análisis de datos RNAseq	39
6.	Estudio estadístico	39
IV.	Resultados	41
1.	Efectos de la determinación del volumen celular	43
1.1.	La velocidad específica de crecimiento en G1 no depende del volumen	43
1.2.	La velocidad específica de crecimiento en S-G2 decrece con el volumen	45
1.3.	El volumen afecta al fitness en las levaduras de gemación	47
1.4.	La velocidad específica de crecimiento en G1 es independiente del tamaño incluso a volúmenes muy grandes	50
1.5.	La velocidad específica de crecimiento en S-G2 disminuye drásticamente a volúmenes muy grandes	51
1.6.	Las células con problemas en el crecimiento pierden la dependencia de la velocidad específica de crecimiento con el volumen.....	54
1.7.	La velocidad específica de crecimiento en S-G2 para el wt no decrece con el volumen de gemación, si va acompañado de un aumento de la cantidad de DNA	56
1.8.	La velocidad específica de crecimiento en S/G2 está afectada por la relación volumen/DNA.....	59
2.	Transporte de vesículas	62
2.1.	La velocidad específica de transporte de Myo2 a la yema disminuye a volúmenes grandes.....	62
2.2.	La velocidad específica de transporte de Sec31 a la yema disminuye a volúmenes grandes.....	65

2.3.	El transporte de Myo2 y Sec31 desde la célula madre hacia la yema es llevado a cabo a través de los cables de actina	66
2.4.	El número de cables de actina no depende del volumen ni de la ploidía	68
2.5.	La concentración de Myo2 durante G1 no disminuye con el volumen	70
2.6.	La concentración de ciertas proteínas de membrana disminuye con el volumen celular en S-G2.....	72
2.7.	La concentración de ciertas proteínas ribosomales varía muy ligeramente con el volumen celular en S-G2.....	75
3.	Diferencias en la expresión de RNA entre células grandes y pequeñas	78
3.1.	Volúmenes de gemación claramente diferenciados entre las muestras grandes y pequeñas para RNAseq	78
3.2.	Alrededor del 96% de los <i>reads</i> fueron correctamente mapeados en el transcriptoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80
3.3.	Las muestras de RNAseq producen resultados coherentes por grupo	81
3.4.	Las muestras de RNAseq fueron obtenidas durante la transición G1/S.....	84
3.5.	Determinadas categorías funcionales muestran una expresión génica alterada en células grandes frente a pequeñas.....	86
3.6.	La velocidad específica de crecimiento en S-G2 disminuye debido a la insuficiencia génica relacionada con diversos mecanismos moleculares.....	92
V.	Discusión.....	95
1.	Velocidad de crecimiento afectada por el tamaño crítico	97
2.	El transporte hacia la yema está afectado por el tamaño crítico	100
3.	Expresión diferencial entre células pequeñas y células grandes	101
3.1.	Las histonas no aumentan su expresión con el volumen celular	101
3.2.	Categorías de genes cuya expresión no escala con el tamaño.....	102
3.3.	Diversas insuficiencias génicas provocan una caída de la velocidad específica de la yema a volúmenes grandes	104
4.	Posibles mecanismos afectados en las células grandes.....	104
4.1.	Interacciones genéticas en las categorías enriquecidas en genes con una menor expresión en las células grandes	104
4.2.	Unión de la RNA polimerasa II a los genes de las proteínas ribosomales durante su transcripción.....	106
4.3.	Los factores específicos de transcripción de los genes de las proteínas ribosomales muestran deficiencias en células grandes.....	107
VI.	Conclusiones	111

VII. Anexos.....	115
1. Abreviaturas.....	117
2. Lista de cepas de levadura utilizadas en este estudio	118
3. Lista de plásmidos utilizados para este estudio	121
VIII. Bibliografía.....	123

I. Introducción

1. Levaduras de gemación (*Saccharomyces cerevisiae*)

En esta tesis se utilizó como modelo a la levadura de gemación *S. cerevisiae* para nuestra investigación, porque podemos aprovechar todas las ventajas que ésta ofrece. Básicamente desde el punto de vista técnico: es barata y fácil de crecer, grandes posibilidades desde el punto de vista de la manipulación genética para la disección de vías moleculares, y posibilidad de hacer cribajes a gran escala.

Esta levadura al ser usada como organismo modelo en el laboratorio, ofrece muchas posibilidades gracias a su fácil manipulación (Botstein and Fink, 1988) y rápido crecimiento, un ciclo celular de tan solo 90min de duración, de media, en un medio rico (Brewer et al., 1984). Se conoce una gran batería de técnicas y protocolos que permiten de forma rápida su modificación genética, y el estudio de sus efectos (Botstein and Fink, 2011). Además, fue el primer organismo eucariota en ser secuenciado (Goffeau et al., 1996).

Este microorganismo unicelular, un hongo ascomiceto, que realiza la mitosis mediante división asimétrica mediante gemación (**Figura 1**), con un tamaño de 10µm de diámetro (Forsburg and Nurse, 1991), se puede encontrar en la naturaleza de forma abundante sobre los viñedos y robles (Greig and Leu, 2009). Entre los años 1930 y 1940, se utilizó por primera vez para investigación esta levadura como modelo por (Mortimer and Johnston, 1986) y desde entonces hasta ahora, se ha utilizado este organismo para el estudio de muchos genes y enfermedades en mamíferos y eucariotas superiores, debido a que sus genes y su función se han mantenido con una alta homología a lo largo de la evolución (Foury, 1997).

En la naturaleza, estas células han evolucionado para adaptarse a diversas situaciones ambientales. Como ejemplo, pueden hacer uso de diferentes fuentes de energía, desde glucosa hasta aminoácidos (aa) (Dann and Thomas, 2006), fuentes de carbono fermentables (glucosa, fructosa, rafinosa, maltosa, galactosa, sacarosa) como no fermentables (glicerol, etanol, acetato). Por otro lado, son capaces de adaptarse a diferentes cambios de pH (Ariño, 2010), a cambios en la presión osmótica (Hohmann, 2002; Hohmann et al., 2007; de Nadal et al., 2002), de temperatura (Verghese et al., 2012; Wu and Li, 2008) y además modificar su ploidía dependiendo de las restricciones nutricionales, como es la aparición de células haploides (**Figura 1A**) a partir de células diploides (**Figura 1B**) mediante la meiosis (Dohlman and Slessareva, 2006).

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

Estos motivos animaron a utilizar esta levadura como modelo en numerosos estudios, pues durante la tesis se trabajó con componentes del ciclo celular, y cómo éstos regulan el

tamaño de las células. Es especialmente interesante, pues se conoce que en esta especie hay una regulación activa que determina el volumen celular dependiente de factores en la fase G1 del ciclo celular, permitiendo un sistema robusto de control del tamaño celular (Aldea et al., 2007).

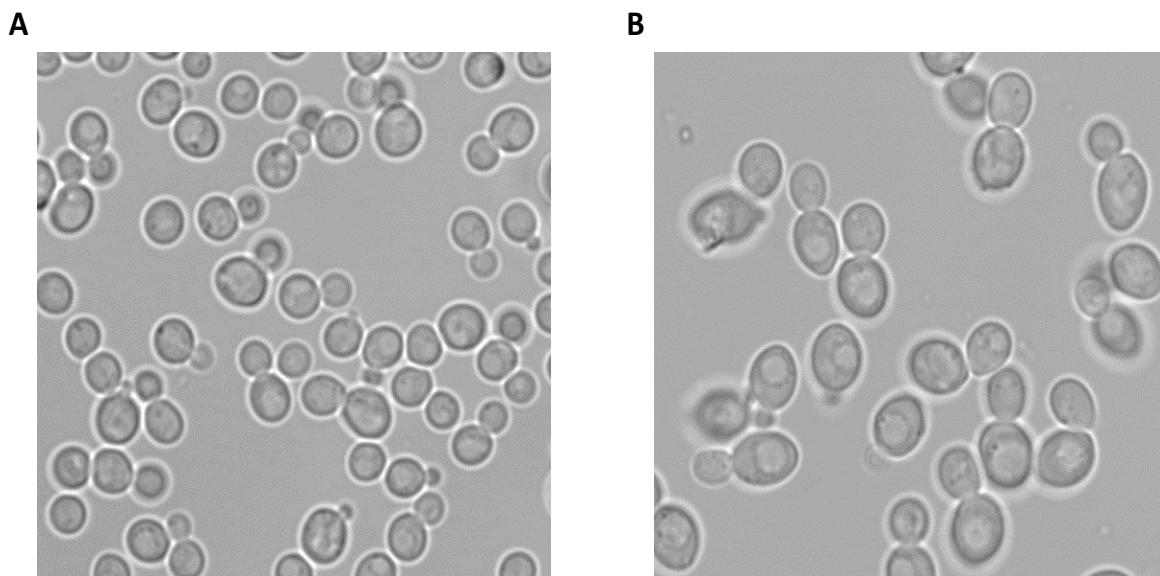


Figura 1: *S. cerevisiae*.

Imágenes en microscopio óptico de campo claro. Células de levadura en un cultivo rico creciendo exponencialmente, de manera asíncrona. Imágenes cedidas por Joan Marc.

(A) Cepa haploide, CML128.

(B) Cepa diploide, 1788.

1.1. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de división asimétrico

La levadura de gemación (*Saccharomyces cerevisiae*), se reproduce mediante la aparición de pequeñas gemas en la pared celular a la vez que inicia la replicación de su material genético durante la fase S del ciclo celular, continúa creciendo durante G2, separándose al final de la mitosis de la célula madre. Las dos células resultantes, a pesar de ser genéticamente iguales, tienen bastantes diferencias debido al reparto asimétrico de contenidos intracelulares y, por tanto, no podemos decir que las dos células, la madre y la hija naciente, sean idénticas. Como microorganismo unicelular que es, una población de *S. cerevisiae* creciente se puede considerar inmortal siempre que tenga alimento suficiente en su entorno, pero no las células individuales: una célula de levadura hija, una vez se convierte en madre, puede llegar a producir alrededor de unas 30 células hijas durante toda su vida replicativa (RLS, *Replicative LifeSpan*), y finalmente muere o se mantiene en una senescencia replicativa (Barton, 1950; Mortimer and Johnston, 1959), mientras que cada una de sus células hijas tienen la capacidad

de ser madres y volver a hacer 25-30 hijas más (excepto las últimas 3-5 células producidas por una madre, que tienen un RLS sensiblemente más corto (Kennedy et al., 1994)).

2. El ciclo celular en células eucariotas

Todas las células que tienen como destino el crecimiento y la reproducción, para el prolongamiento de su vida, y lo logran gracias a un programa molecular complejo, el cual se repite constantemente con la finalidad de obtener una copia exacta de ella misma manteniendo las características propias de la especie a la que pertenece, para poder perpetuarse a lo largo del tiempo.

El ciclo celular en eucariotas (**Figura 2**) ha sido descrito siempre visualmente como un círculo, que se delimita por los acontecimientos clave que incluyen desde el crecimiento celular, replicación del DNA, división nuclear (mitosis) y celular (citocinesis) (Morgan, 2007). El ciclo celular se divide, por tanto, en dos interfases en las que la célula crece y duplica su DNA (G1-S-G2), y finalmente cuando las células están preparadas se dará la división en el último periodo (fase M), en el que tiene lugar la mitosis y la citocinesis, momento en el que se disloca de la madre y comienza su vida independientemente, iniciándose un nuevo ciclo.

En *S. cerevisiae* (**Figura 2A, 2C**) durante la primera fase del ciclo (G1), la célula aumenta su tamaño hasta alcanzar el llamado tamaño crítico, cuya regulación depende de diversos elementos del ciclo celular y chaperonas implicadas (Ferrezuelo et al., 2012). Se prepara gracias a una alta actividad transcripcional y traduccional para la replicación del DNA. Cuando se dan las condiciones correctas para comprometerse a iniciar un nuevo ciclo celular, las células ejecutan *START* (Johnston et al., 1977), una transición hacia un estado irreversible para finalizar la fase G1. Seguidamente se inicia la fase S, donde se da la duplicación del DNA y el crecimiento polarizado de la yema o futura célula hija (Hartwell, 1971). Tras esta fase se encuentra la fase G2, en la que la yema continúa creciendo, pero se produce un cambio desde un crecimiento polarizado hacia un crecimiento isotrópico (como en G1), la preparación de la maquinaria para la mitosis (mediante el inicio del empaquetamiento de los cromosomas) y actividad de diferentes mecanismos de reparación del DNA. En la última fase, las cromátidas hermanas son compactadas y unidas a microtúbulos. Una vez este proceso se lleva a cabo correctamente y se consigue una correcta orientación de todos los pares de cromátidas hermanas, se destruye la unión que las mantenía juntas y son atraídas hacia los SPBs durante la anafase. Una vez acabada la mitosis, se inicia la citocinesis, dando como resultado dos células que mantienen el mismo número de cromosomas que la célula original.

Dado que en las levaduras la mitosis se da en forma de gemación, se producen dos tipos de células que varían en volumen con cada ciclo celular: una célula madre (generadora de la gemación) y una célula hija o recién nacida (procedente de la yema). Los tiempos de las diferentes fases varían, especialmente en G1, ya que las células hijas recién nacidas deberán alcanzar el tamaño crítico de *START* antes de la gemación. Un cultivo celular de levaduras rico

en glucosa y en condiciones óptimas de laboratorio mantiene un tiempo medio aparente de duplicación de aproximadamente 90-120 minutos, mientras que en nuestras células tarda unas 24h. Una célula hija tiene una duración aproximada de la fase G1 de 42 min y de las fases S-G2-M de 57 min, comportando una duración de ciclo completo de unos 100 min aproximadamente. En el caso de la célula madre, la duración aproximada de G1 es 22 min y de las fases de S-G2-M de 59 min (unos 85 min un ciclo completo) (Brewer et al., 1984).

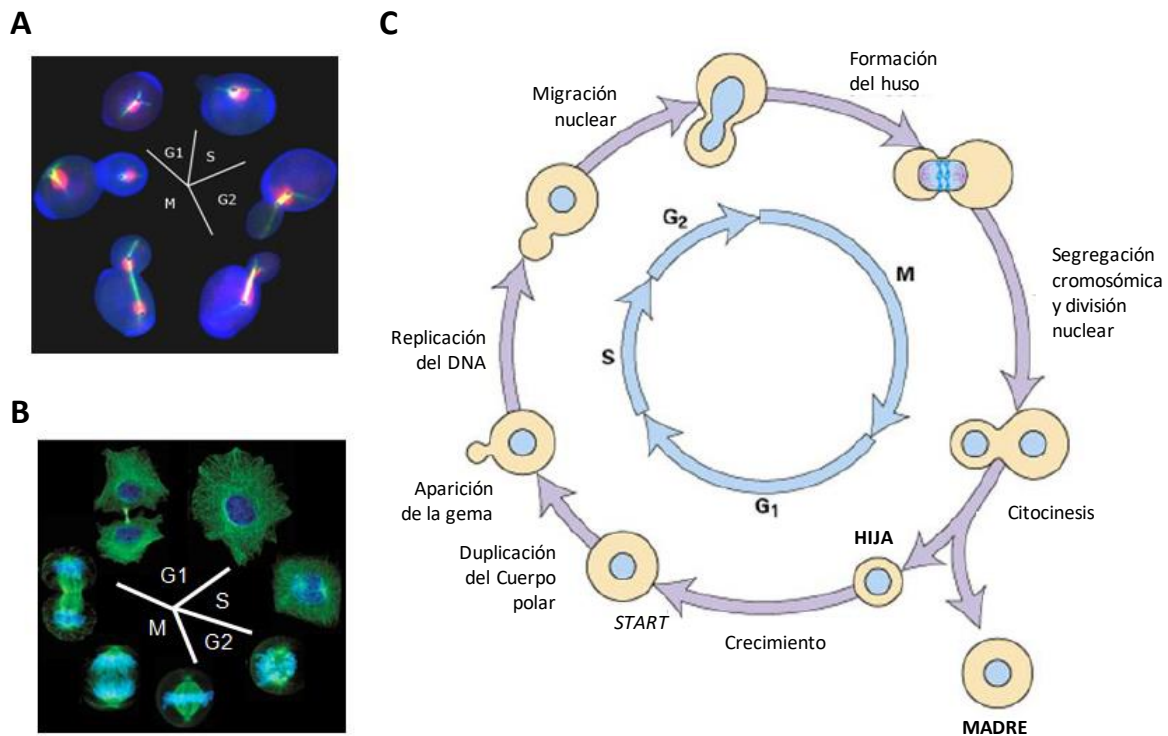


Figura 2: Ciclo celular en eucariotas.

(A) Comparativa de los ciclos y morfologías bajo el microscopio para *S. cerevisiae*. y (B) células de mamífero. (C) Representación esquemática del ciclo celular en *S. cerevisiae*, donde se muestran las diferentes morfologías durante las fases del ciclo celular: G1, S, G2 y M, y los principales acontecimientos, adaptado de Johns Hopkins University.

Una de las ventajas de la levadura como modelo de estudio del ciclo celular es que observando a las células bajo microscopio podemos saber aproximadamente en qué momento del ciclo se encuentran (**Figura 2**). Así, si vemos una célula sin ninguna protuberancia sabemos que está en G1 (o G0), si tiene una yema pequeña está al inicio de fase S, si la yema es grande está en S-G2 y cuando la madre y la yema son de tamaños muy similares están en la fase M. Estos sucesos a nivel molecular se pueden definir en función de la actividad CDK-Ciclina que hay en cada momento, cada una de las cuales promueve la activación de la siguiente e induce su propia degradación.

2.1. Control en la progresión a través del ciclo celular por complejos CDK-Ciclina

El componente central en el sistema de control de ciclo celular es la CDK (*Cyclin Dependent Kinase*). En *S. cerevisiae* existe una única CDK llamada Cdc28, la cual conduce todo el ciclo celular, aunque en organismos superiores existen CDKs específicas para cada una de las fases del ciclo celular. Como su propio nombre indica, las CDKs son quinasas que fosforilan otras proteínas (sustratos), y esta fosforilación puede activar o inhibir la función de éstas, o incluso cambiar su localización subcelular o señalizarla hacia la degradación (la naturaleza de las proteínas diana es variada: desde factores transcripcionales a represores e incluso proteínas G). Además, su actividad quinasa y qué sustratos fosforilar depende de otras proteínas, llamadas ciclinas (Evans et al., 1983; Kobayashi et al., 1992). Por ello, con qué tipo de ciclina están en cada momento es lo que determina la fase del ciclo celular (**Figura 3**) (Bloom and Cross, 2007).

Los complejos CDK-Ciclina no se activan por sí solos, sino que una vez formados es necesario que sean activados por otra quinasa (CAK, *CDK Activating Kinase* (Espinoza et al., 1996)). Pero la actividad de CAK no está regulada, así que se puede considerar una modificación postraduccional más y, por ello, quien regula la actividad de la CDK continúa siendo la ciclina a la que esté unida. También existen más quinasas (Swe1 (Booher et al., 1993), Mih1 (Russell et al., 1989)) que pueden inhibir a los complejos CDK-Ciclina. Los complejos CDK-Ciclina se degradan cuando llega el momento adecuado, previa ubiquitinación por parte de una de las dos E3 ligasas que participan en el ciclo celular: SCF (Skp, Cullin, F-box) y APC (*Anaphase-Promoting Complex*).

Las ciclinas de levadura de gemación las podemos dividir en dos grupos: ciclinas de G1 (Clns) y ciclinas de tipo B (Clbs), que regulan los sucesos durante las fases S y M. Las Clns son degradadas por complejos SCF^{Grr1/Cdc4}, mientras que las Clbs son degradadas por APC^{Cdc20/Cdh1} (aunque se ha visto que Clb6 puede ser eliminada por acción de SCF^{Cdc4}). El ciclo comienza con una actividad CDK prácticamente nula y el APC con Cdh1, para eliminar cualquier Clb que pueda haber del ciclo anterior. La ciclina que acompaña a Cdc28 al inicio del ciclo celular es Cln3 (Cross and Blake, 1993) (ciclina de G1), la cual se expresa constitutivamente a niveles muy bajos, lo que produce una proteína muy inestable. Por lo tanto, esta ciclina es la excepción en cuanto al fuerte control transcripcional de esta familia de proteínas. Por contra, el hecho de expresar una proteína tan inestable, permite ser un sensor excepcional de las señales extracelulares (ya que, si hay problemas, se degradará y no hará comenzar el ciclo celular con unas condiciones ambientales subóptimas). Y cuando los niveles nucleares de Cln3 son bastante altos, es capaz de activar la ola transcripcional que induce grandes cantidades de Cln1 y Cln2 (ciclinas de G1/S) gracias a un ciclo de retroalimentación positivo, ya que entre los genes que se expresan por orden de Cln1,2 se incluyen ellos mismos y seguidamente se activa la transcripción de las ciclinas de la fase S (Clb5,6), que son inhibidas por Sic1.

Cuando el aumento de la actividad quinasa de Cln1,2 es lo bastante alta como para polifosforilar y degradar a Sic1, Clb5,6 pasan a ser activas y se inician los procesos de la fase S (básicamente la duplicación del DNA). Una vez el DNA ha sido duplicado, por acción de Clb5,6 se fosforila Cdh1 del complejo APC^{Cdh1}, se inactiva (Lubischer, 2007), y se empiezan a acumularse las ciclinas de la fase M (primero Clb3,4 y después Clb1,2) que conducen el ciclo celular hacia la transición metafase-anafase. Después, se activa APC^{Cdc20} por fosforilación de Cdc20 (cuando la actividad CDK-Ciclina M es máxima), y es en ese momento en el que se degradan los complejos CDK-Ciclina y se reduce la actividad quinasa, con lo que se reparten las cromátidas hermanas entre las dos células y se produce la citocinesis. Al caer la actividad quinasa, Cdc20 se desfosforila y APC vuelve a cargarse con Cdh1 (el cual no debe estar fosforilada para funcionar), volviendo al principio y dando por acabado el ciclo celular.

La direccionalidad e irreversibilidad del ciclo se basa en un principio simple: se tiene que inactivar el inhibidor de la siguiente ciclina por parte de la ciclina anterior, la cual es inmune a dicho inhibidor.

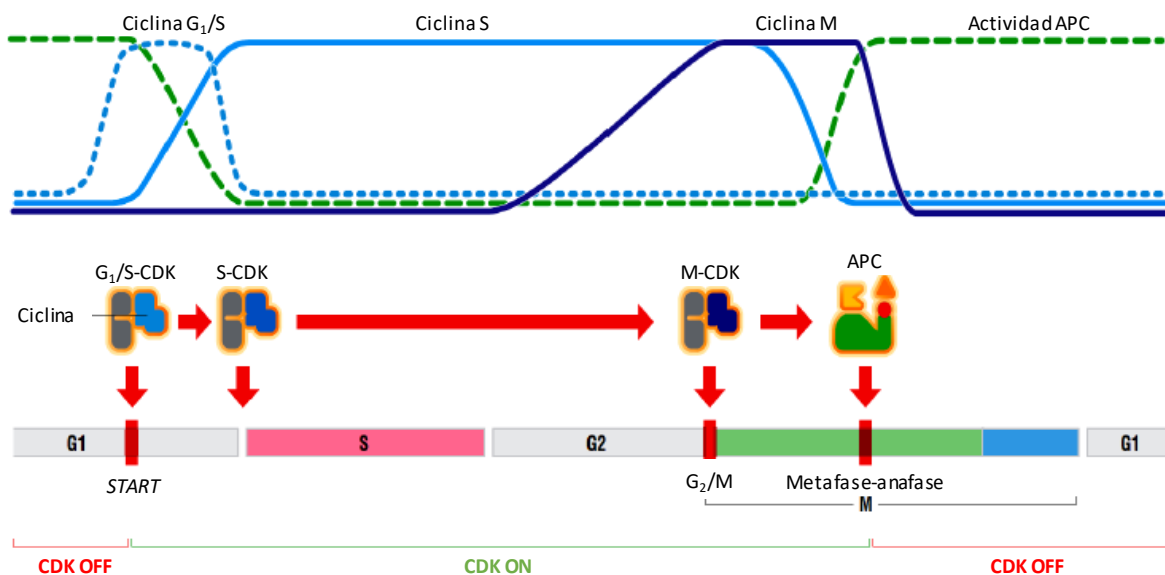


Figura 3: Esquema del sistema de control del ciclo celular

Niveles durante el ciclo celular de los tres tipos mayoritarios de ciclinas y actividad del APC/C (arriba) y oscilaciones de los complejos Ciclina/CDK a lo largo de los diferentes eventos del ciclo celular (abajo). La formación de complejos activos de G₁/S-CDK inician un nuevo ciclo de división a través de la superación del checkpoint START. Este evento activa los complejos S-CDK que inician la replicación del DNA al inicio de la fase S. Tras completar la fase S, se activan los complejos M-CDK resultando en la entrada y progresión a través de la fase G₂/M y formación del huso mitótico. La activación del APC/C promueve la separación de las cromátidas hermanas y el inicio de la transición metafase-anafase. La actividad del APC/C causa la destrucción de las ciclinas de fase S y M y la inactivación de la CDK. La actividad del APC/C se mantiene durante G₁ hasta que la actividad G₁/S-CDK vuelve a activar un nuevo ciclo celular. Vía no aplicable a todos los seres vivos, uso como mecanismo general. Adaptado de (Lubischer, 2007).

2.2. CDC28: la principal CDK del ciclo celular y sus ciclinas

En *S. cerevisiae*, la principal CDK encargada de coordinar y regular el ciclo celular es Cdc28 o CDK1 (Hartwell, 1973), esencial para su viabilidad. Las ciclinas descritas para Cdc28 se clasifican en dos grupos, las ciclinas de G1 (Cln1, Cln2, Cln3) y las ciclinas de tipo B, que se reparten por todas las fases (Clb1, Clb2, Clb3, Clb4, Clb5 y Clb6) (**Figura 4**). El primer complejo en formarse en el ciclo celular durante G1 es Cln3/Cdc28, activador de *START* (Stuart and Wittenberg, 1995), el cual promueve la liberación por fosforilación de Whi5, un importante inhibidor de los factores de transcripción SBF (*Swi4 cell cycle Binding Factor*) y MBF (*Mlu1 cell cycle Box binding Factor*). Estos complejos controlan la expresión de decenas de genes durante la transición G1/S (Futcher, 2002). De especial importancia, los complejos SBF compuestos por las proteínas Swi4 y Swi6 se encargan de las ciclinas *CLN1* y *CLN2*, que activarán un *feedback* positivo e irreversible de iniciación de *START*, mientras que el complejo MBF, compuesto por las proteínas Mbp1 y Swi6, se encarga de *CLB5* y *CLB6* (Moll et al., 1993).

Cuando aparece el complejo Cln2/Cdc28, éste lleva a cabo la inactivación por fosforilación del inhibidor Sic1, liberando la actividad del sistema Clb5/Cdc28 que promueve la entrada en la fase S (Schwob and Nasmyth, 1993), debido a la fosforilación de ciertos componentes del complejo pre-replicative (Dahmann et al., 1995). Durante la fase S entran en juego Clb3 y Clb4, involucradas en la duplicación del SPB y finalización de la duplicación del DNA (Richardson et al., 1992). Finalmente, durante la fase G2 aparecen Clb1 y Clb2, las cuales activan la segregación cromosómica y el crecimiento isotrópico de la yema, e inhiben eventos de G1.

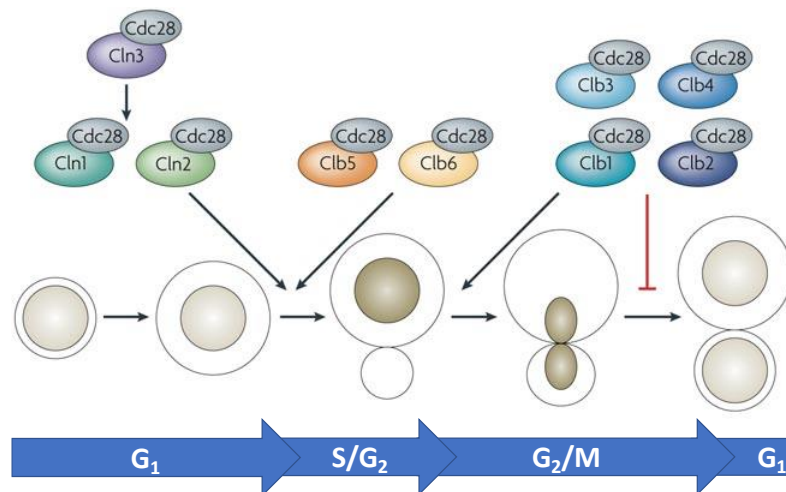


Figura 4: Ciclinas en el ciclo celular de *S. cerevisiae*.

Las ciclinas activan a Cdc28 para el correcto progreso a través del ciclo celular. Las ciclinas de la fase G1 (Cln1, Cln2 y Cln3), promueven la duplicación del cuerpo polar del huso, la aparición de la yema y la activación de las ciclinas de tipo B. Las ciclinas de la fase S (Clb5, Clb6) avanzan la duplicación del DNA y las ciclinas de fase M (Clb1, Clb2, Clb3 y Clb4) activan la formación del huso mitótico y el comienzo de la mitosis. Las ciclinas de fase M inhiben la salida de mitosis y la división celular. Finalmente, la citocinesis genera la división de la célula madre y la nueva célula hija y el inicio de un nuevo ciclo. Adaptada de (Bloom and Cross, 2007).

Existe otra CDK denominada Pho85, aunque no esencial para la viabilidad celular. Esta CDK está también relacionada con el control del ciclo celular (Huang et al., 2007). Entre sus actividades cabe destacar su papel en la progresión por la fase G1, la formación del citoesqueleto de actina, la polarización celular y la señalización de las condiciones de crecimiento (Carroll and O'Shea, 2002), en relación a la coordinación entre el ciclo celular y la disponibilidad de nutrientes (Hernández-Ortega et al., 2013; Menoyo et al., 2013; Truman et al., 2012).

3. Entrada y ejecución de START

En las células de *S. cerevisiae*, uno de los eventos más importante tiene lugar durante la fase G1, donde se alcanza el tamaño celular suficiente o tamaño crítico, permitiendo superar el *checkpoint* conocido como *START*, momento en el cual las células entran en el ciclo celular de forma irreversible. En esta etapa, las células obtienen un tamaño suficiente como para llegar a completar un nuevo ciclo manteniendo las condiciones óptimas que permitan su viabilidad y mantener un volumen constante en la población. Por este motivo, durante la fase G1 existe una coordinación y regulación entre el tamaño y el ciclo celular. Se debe considerar la regulación del volumen celular como un gran sistema interconectado de procesos donde convergen diversas respuestas. La coordinación y precisión entre ciclo celular y crecimiento es un problema actual en biología, ya que probablemente se puedan aplicar dichos conocimientos a todos los organismos (Baserga, 2007; Cook and Tyers, 2007; Cooper, 2004; Donachie and Blakely, 2003; Grebien et al., 2005; Mitchison, 2003; Zaritsky et al., 2007).

S. cerevisiae ha sido utilizado para el estudio de los procesos que determinan el volumen celular gracias a que tiene dos características universales para su control: un tamaño crítico o límite para la ejecución de *START* y la entrada al ciclo celular (Hartwell and Unger, 1977; Johnston et al., 1977) y una relación masa/ploidía constante (Mortimer, 1958).

La ejecución de *START* (**Figura 5**) comienza con la activación del complejo formado por Cln3 (Cross, 1988; Dirick et al., 1995; Nash et al., 1988; Sudbery et al., 1980), ciclina de la fase G1, y Cdc28 (Mendenhall and Hodge, 1998a). Cln3/Cdc28 fosforilan Whi5, el inhibidor transcripcional (y probablemente también a Swi6), en múltiples aa para activar SBF y MBF (De Bruin et al., 2004). Gracias a esta activación transcripcional entran en juego otras dos ciclinas de G1, Cln1 y Cln2, que conjuntamente a Cdc28 activarán una retroalimentación positiva para la entrada irreversible en *START* (Dirick et al., 1995; Skotheim et al., 2008), produciendo una cascada transcripcional de aproximadamente 200 genes implicados en las siguientes etapas del ciclo celular (Futcher, 2002).

La ciclina Cln3 se mantiene en niveles constantes a lo largo de la fase G1 (Tyers et al., 1993) y su control consiste en un mecanismo de retención y liberación desde del retículo endoplasmático (RE), lo cual previene su acumulación en el núcleo (Aldea et al., 2007). Whi3 fue el primer gen identificado como regulador negativo de Cln3 (Nash et al., 2001), el cual se

une a su mRNA y secuestra a Cdc28 para retener eficientemente el complejo Cln3/Cdc28 en el RE al comienzo de la fase G1 (Wang et al., 2004). Al final de la fase G1, la chaperona Ydj1 juega un papel esencial en la liberación de Cln3 o del complejo Cln3/Cdc28 retenido en el RE, la cual permite su entrada y acumulación en el núcleo y el inicio de *START* (Vergés et al., 2007). Junto con otras chaperonas multifuncionales, Ydj1 tiene otras actividades muy importantes en otros procesos celulares, como la translocación de proteínas al lumen del RE, un proceso clave en el crecimiento celular.

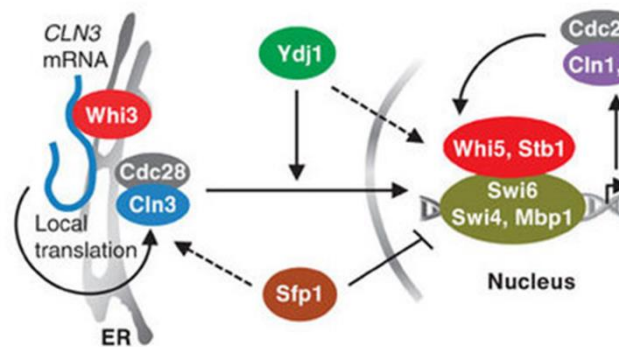


Figura 5: Esquema molecular de la activación de START

El complejo Cln3/Cdc28 es transportado al núcleo donde fosforila al represor Whi5. Los factores de transcripción MBF y SBF son liberados para iniciar la transcripción del regulón G1/S e inicio del ciclo celular. Whi3 y Ydj1 actúan como reguladores, negativo y positivo respectivamente, sobre la liberación del complejo Cln3/Cdc28 del RE y su acumulación en el núcleo. Cln1 y Cln2 actúan positivamente para generar una activación robusta y coherente de los factores MBF y SBF. Esquema adaptado de (Vergés et al., 2007).

Este sistema de regulación abre novedosas líneas de investigación e interesantes estudios en el complejo sistema molecular por el que se regula. Recientemente, un estudio con mutantes de Cdc28, presentes en células de tamaño reducido llamada Cdc28^{wee}, han permitido el descubrimiento de nuevos reguladores de dicho sistema como es Whi7 (Yahya et al., 2014), un parálogo de Whi5, el cual permite establecer una retroalimentación positiva sobre la liberación del complejo Cln3/Cdc28, y Whi8, una proteína de unión a RNA, que está presente en gránulos de estrés y en los llamados *P-bodies*, y que permitiría la retención del mRNA de *CLN3*.

3.1. Regulón G1/S

Como se ha dicho anteriormente, el regulón G1/S es un conjunto de más de 200 genes que son activados transcripcionalmente tras la ejecución de *START* (Futcher, 2002), muchos de ellos directamente conectados con la progresión del ciclo celular (Cho et al., 1998a;

Spellman et al., 1998). Este regulón se regula por dos factores transcripcionales con componentes de unión al DNA únicos, Swi4 (SBF) o Mbp1 (MBF), los cuales contienen en común a Swi6, quien actúa como un cofactor transcripcional.

El sitio de unión para MBF también es llamado caja del ciclo celular Mlu (o MCB, *Mlu Cell cycle Box*) ya que presenta un sitio de restricción para la enzima *MluI*, y en el caso de SBF es llamado la caja del ciclo celular Swi4 (o SCB, *Swi4 Cell cycle Box*). Los genes diana de SBF y MBF han sido definidos por la presencia redundante de secuencias SCB y MCB en sus promotores. Los genes diana de SBF y MBF son funcionalmente distintos. Los genes diana de SBF están relacionados con la formación del huso y su duplicación, la morfogénesis, y el crecimiento celular como *CLN1*, *CLN2*, *GIN4*, *PCL1*, *PCL2*, *FKS1*, *FKS2*. En cambio, MBF activa la expresión de genes relacionados con la regulación y ejecución de la duplicación y reparación del DNA como *CDC2*, *POL2*, *RNR1*, *CLB5*, *CLB6*, (Koch et al., 1993; Nasmyth and Dirick, 1991; Slansky and Farnham, 1996).

4. Regulación del tamaño celular

Existe una estrecha relación entre la forma y la función en los organismos vivos (Thompson, 1961). Una de las características más importantes en la morfología celular es el tamaño, que permite determinar la relación superficie/volumen para una mejor adaptación al medio ambiente. El volumen celular es una de las características adaptativas más importantes en la fisiología celular para todas las especies (Turner et al., 2012).

El tamaño celular afecta a la estructura interna de la célula y al volumen de los orgánulos y su proporción (Chan and Marshall, 2010), y se adapta a la cantidad de DNA en una relación lineal (Gregory, 2001). Pero aún se desconoce el mecanismo por el cual las células pueden regular el tamaño en función del material genético. Los principales estudios en el control del tamaño celular se basan en el modelo de trabajo *S. cerevisiae*, y también en *S. pombe*, ya que permiten analizar el volumen celular bajo unas formas geométricas más sencillas que en células eucariotas de organismos superiores. Los estudios en estos sistemas unicelulares han conseguido obtener evidencias de la existencia de un mecanismo activo del control del volumen celular, y donde tiene lugar una relación entre el crecimiento y la división celular (Johnston et al., 1977; Sveiczzer et al., 1996; Talia et al., 2007). En levaduras de gemación, el tamaño afecta la duración de la fase G1, alargando el momento de iniciar la replicación y la gemación si células inician el ciclo con un volumen menor. En la levadura de fisión se observa un retraso en mitosis antes de alcanzar un volumen celular característico (Nurse and Thuriaux, 1977). Los leucocitos de mamíferos tienen que alcanzar una tasa específica de crecimiento y las células epiteliales deben crecer hasta alcanzar cierto volumen antes de proceder a la entrada en el ciclo (Dolznig et al., 2004; Son et al., 2012; Tzur et al., 2009).

4.1. Regulación del Volumen celular en *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae*, el tamaño celular se determina en G1 y está influenciado por múltiples factores (**Figura 6**). Los estudios en organismos unicelulares han permitido observar como las células más pequeñas dedican más tiempo en crecer durante G1 que las células inicialmente más grandes (Johnston et al., 1977), por lo que se estableció el concepto de tamaño crítico como condición a superar para entrar en la transición G1/S (Johnston et al., 1979). La asimetría en la división de las levaduras de gemación tiene un papel importante sobre la regulación del tamaño. La célula hija nace con un volumen menor al de la célula madre, y debe crecer hasta conseguir el tamaño crítico para iniciar su ciclo celular. En cambio, al haber alcanzado dicho tamaño crítico en el ciclo anterior, la célula madre puede iniciar la gemación en ciclos posteriores sin necesidad de crecer demasiado (Hartwell and Unger, 1977; Lord and Wheals, 1983). Esa diferencia ha sido relacionada con la distribución asimétrica de los factores transcripcionales Ace2 y Ash1, los cuales controlan la transcripción de Cln3 específicamente en células hijas (Colman-Lerner et al., 2001; Cosma, 2004; Laabs et al., 2003; Di Talia et al., 2009; Weiss et al., 2002).

De los reguladores de *START*, Whi5 es el que tiene las evidencias más claras de su importancia en el control del tamaño celular. Éste es un inhibidor de la transcripción durante G1/S, se sintetiza principalmente en la mitosis del ciclo anterior independientemente al tamaño de la célula, y se diluye por el aumento del volumen celular durante el crecimiento en la fase G1 hasta un umbral mínimo, el cual permite la activación del regulón G1/S (Schmoller et al., 2015). Por ello, Whi5 podría ser un sensor del incremento de tamaño que tiene lugar en G1 y participar en el establecimiento del tamaño crítico en *START*.

La participación de Cln3 en la regulación del tamaño celular está muy comprobada desde hace tiempo entre los investigadores del ciclo celular de la levadura (Cross, 1988; Futcher, 1996; Wijnen et al., 2002), y existiendo una dependencia inversa del volumen celular con los niveles del complejo Cln3/Cdc28 (Charvin et al., 2010; Skotheim et al., 2008). Cln3 es un activador dependiente de la dosis durante la transición G1/S o *START* (Schmoller et al., 2015; Shilo et al., 1979) y, a diferencia de las otras ciclinas, sus niveles oscilan muy ligeramente (Di Talia et al., 2009; Tyers et al., 1992, 1993), siendo una proteína muy inestable, con una vida media de apenas 5 min (Cross, 1988; Nash et al., 1988; Tyers et al., 1992, 1993).

La relación entre el mecanismo de activación de Cln3 y el tamaño crítico no se conoce todavía. Existen ciertas hipótesis de que el crecimiento durante G1 podría alterar la disponibilidad de chaperonas como Ydj1 y, así, facilitar la eventual liberación de Cln3 del RE y su acumulación en el núcleo para activar *START* (Aldea et al., 2007).

Otros mecanismos podrían estar también involucrados en la determinación del volumen celular. Uno de ellos consistiría en el número de promotores MBF/SBF existentes en el genoma, lo que implicaría una necesidad más elevada de Cln3 a mayores dosis génicas, relacionando así el tamaño celular con la ploidía (Wang et al., 2009).



Figura 6: Posibles mecanismo de conexión entre tamaño y ciclo celular.

Resumen especulativo sobre los mecanismos que influyen el ciclo celular dependiente del tamaño. Los nutrientes estimulan el crecimiento mediante un incremento de ribosomas en su actividad y síntesis. Altos niveles de traducción podrían incrementar las concentraciones de un indicador de crecimiento inestable, que podría ser la sugerida Cln3. Cuando Cln3 obtiene niveles suficientes se promovería la activación de START. Otros modelos implican la actividad dependiente de chaperonas asociada a la ratio de crecimiento, como factor liberador de Cln3. Este límite de crecimiento podría estar ajustado por nutrientes u otros factores, resultando en diferentes tamaños celulares, posiblemente dependiente de la síntesis de los ribosomas. Este incremento de ribosomas inhibiría la activación de SBF y MBF por vías aún desconocidas. Otra incógnita es como una elevada ploidía celular también reduce la activación de SBF y MBF, por un mecanismo que aún es desconocido. Adaptado de (Lubischer, 2007).

Estos mecanismos que implican a la maquinaria de *START* podrían coordinarse para determinar el tamaño crítico de una forma robusta y precisa, por lo que cualquier modificación en la transcripción de Whi5 o Cln3, (Shi and Tu, 2013), o en su traducción (Polymenis and Schmidt, 1997) o estabilización (Menoyo et al., 2013) podrían implicar

variaciones en el tamaño celular. Además, la transición a través de *START* también depende del complejo Ccr4-Not y *BCK2* (Di Como et al., 1995; Manukyan et al., 2008).

Otro parámetro clave en la regulación del volumen celular es la expresión de proteínas (Johnston et al., 1977; Moore, 1988; Popolo et al., 1982), ya que se observa una clara relación entre el tamaño celular y las velocidades de síntesis de ribosomas y de traducción de proteínas (Bernstein et al., 2007; Moretto et al., 2013). La iniciación de la traducción debe tener una relevancia muy importante, ya que su inhibición mediada por la vías de señalización TOR y PKA en respuesta a falta de nutrientes permitiría explicar el menor volumen de las células sometidas a esta limitación nutricional (Barbet et al., 1996; Smets et al., 2010).

Muchos de los reguladores más importantes se han conocido por estudios sistemáticos de mutantes que provocan variaciones en la distribución del tamaño dentro de las poblaciones celulares (Dungrawala et al., 2012; Jorgensen et al., 2002; Ohya et al., 2005; Zhang et al., 2002). Pero estos estudios tienen ciertas limitaciones, porque es complicado diferenciar entre los mutantes que afectan directamente al sistema de control del tamaño celular o que tienen un efecto indirecto variando la morfología propia de las células (Di Talia et al., 2009). Por este motivo es tan útil la microscopía *time-lapse*, para el estudio de la regulación del tamaño celular (Soifer and Barkai, 2014; Di Talia et al., 2009).

4.2. Tamaño celular y ploidía

En un estudio (Wilson, 1925) observaron una clara relación entre el número de cromosomas, el volumen del núcleo y el de la célula. Fenómeno que todavía hoy continúa siendo foco de discusión. En los años 50, tras el estudio de múltiples sistemas celulares se estableció una relación de proporcionalidad casi directa entre ploidía, el número de juegos completos de cromosomas y el volumen de la célula, considerándose una propiedad casi universal (Gregory, 2001). En el caso de las levaduras, se ha podido comprobar también una relación directa concluyendo que la ploidía determina el tamaño de las células en división (Mortimer, 1958; Mundkur, 1953). Pero la relación entre esas dos características continúa siendo una incógnita (Tsukaya, 2008).

Una de las hipótesis más sencillas se limita a considerar el número de copias génicas, lo que daría como efecto final a un incremento del tamaño celular. Sin embargo, existen evidencias de que este incremento de tamaño dependiente de la ploidía debe de tener un sistema activo de regulación (**Figura 7**).

En *S. cerevisiae*, existe una clara relación lineal entre el tamaño de la célula y su contenido de DNA, sugiriendo dos posibles modelos que permitirían que el tamaño celular estuviera regulado por la ploidía: la producción de un factor específico acorde con la ploidía, o un factor inversamente dependiente de la ploidía (Marshall et al., 2012).

El primer modelo podría basarse en un inhibidor específico de una etapa del ciclo celular, cuya expresión respondiese al número de copias de DNA. Si dicha expresión crítica fuera estable, la cantidad fija producida del inhibidor se diluiría conforme la célula aumenta de volumen hasta llegar a un umbral y fijar así un tamaño crítico en función de la ploidía (Fantes et al., 1975). Esta hipótesis parece coger importancia actualmente debido a las observaciones y estudios de *Whi5*, que se transcribe en el anterior período G2-M y de forma dependiente de la dosis génica, pero independiente de tamaño, y el cual se diluye durante la siguiente fase G1 hasta alcanzar un nivel mínimo o umbral determinado en *START* (Schmoller et al., 2015). Pero la delección de una de las copias de *Whi5* en el diploide no produjo un volumen celular igual a un haploide, lo que sugiere la existencia de otros factores aún desconocidos.

El segundo modelo se basaría en la existencia de un factor regulado por titulación genómica (Donachie, 1968; Fantes et al., 1975; Sompayrac and Maaløe, 1973). Podría tratarse de una proteína activadora expresada de forma constante y que se uniera a diversas secuencias del genoma. Así, el incremento en la ploidía incrementaría el número de sitios de unión y requeriría un mayor nivel de dicho activador que, al ser su síntesis constante, implicaría un mayor tamaño celular. Dicho modelo se ha sugerido para *Cln3* en su unión a los complejos SBF (Wang et al., 2009).

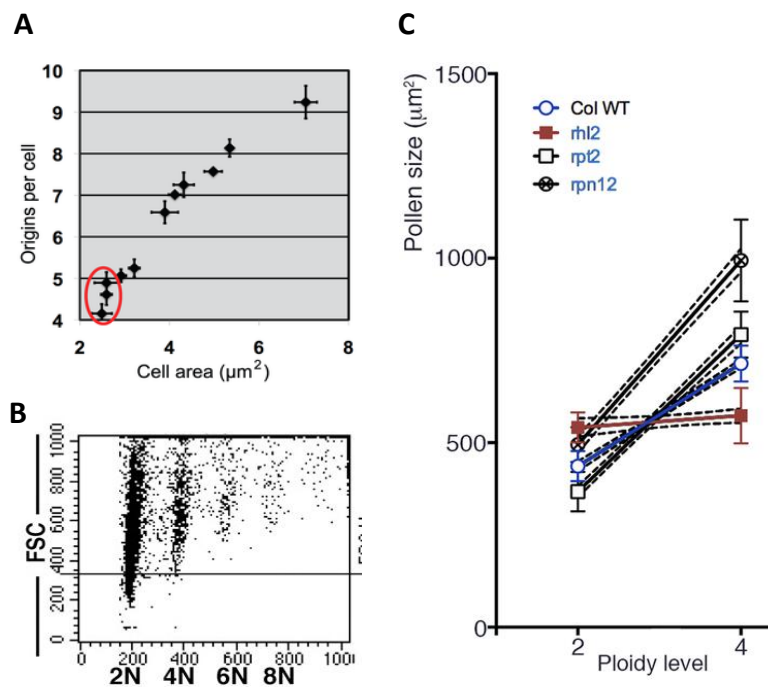


Figura 7: Evidencias de un tamaño celular regulado por ploidía.

A lo largo de todo el árbol de la vida se encuentran ejemplos de cómo las células incrementan su tamaño celular dependiente de la ploidía. En *E. coli* se observa una clara dependencia del área celular con el número de orígenes de replicación (A) (Hill et al., 2012), en células de mamífero, en hepatocitos, se observa distribuciones poblacionales que incrementan de tamaño a la vez que lo hacen según su número de ploidía (B) (Baena et al., 2005) y en plantas también se observan en el tamaño del polen un incremento dependiente del nivel de ploidía (C) (Tsukaya, 2013).

Las células son capaces de modificar su ploidía de una forma activa para una mayor capacidad de adaptación a entornos desfavorables y a diversos tipos de estrés (Berman, 2016). Este fenómeno puede aportar ventajas metabólicas y la protección contra mutaciones deletéreas (Comai, 2005; Sorenson et al., 2015; Storchova and Pellman, 2004). Pero todo ello a costa de un incremento en los defectos en la estabilidad genómica (Andalis et al., 2004; Mayer and Aguilera, 1990).

5. Crecimiento en superficie y volumen en levaduras de gemación

5.1. Una antigua teoría: La relación área superficial/volumen celular como causante de la división de las células

Hasta no hace mucho, se pensaba que el por qué las células se dividían se debía al tamaño celular y a la relación área de la superficie celular frente al volumen, pues conforme crece la célula, dicha relación decrece. Con ello, ya no sería tan eficiente la velocidad del transporte a través de la membrana (para la ingesta de nutrientes, agua y oxígeno, y la eliminación de toxinas), al igual que la difusión en el interior celular de las sustancias químicas necesarias en los procesos biológicos, para un crecimiento celular óptimo. Llegado ese límite, la célula se dividiría.

Pero se ha visto que eso no es así. Trabajando con la levadura *S. cerevisiae*, nuestro laboratorio estudió un mutante (BF305 pGal-Cln3; Δ cln1,2) que solo es capaz de entrar en el ciclo celular y dividirse bajo un medio con galactosa, mientras que, si hay glucosa presente, las células seguirán creciendo (en volumen), pero no entrarán en ciclo, pues se quedarán retenidas en G1. Así, se vio que dicho mutante, bajo condiciones de crecimiento en glucosa, seguía creciendo como el wt, sin los problemas relacionados con la relación SA/V. Su volumen en G1 creció de manera exponencial con el tiempo (y no de manera lineal, como se creía al observar el período de tiempo de la etapa del ciclo celular G1 en células que sí podían entrar en división). Con lo que vieron que, debido a una disminución de la relación área superficial/volumen celular, y la posible merma de ingesta de nutrientes, el crecimiento celular no se vería disminuido. O es que no habría una menor ingesta.

5.2. Relación entre tamaño celular y velocidad de crecimiento

Como se mencionó anteriormente, la fisiología celular, y los procesos biológicos relacionados, están muy afectados por el tamaño y la forma de la célula, creyéndose que las células ajustan estos parámetros con el fin de optimizar su desarrollo y adaptación a las condiciones medioambientales. Por otro lado, se han estudiado multitud de factores, y sus

mecanismos, con efectos sobre el tamaño de las células, permitiendo esto entender en buena medida el control y la regulación del tamaño celular (Lloyd, 2013).

Desde hace 100 años, existe un hecho universal sobre el control del tamaño celular: cuanto más rápido crecen las células, más grandes serán (Peyton Green, 1923). Aun así, los mecanismos moleculares exactos involucrados en coordinar el crecimiento y la proliferación, y en determinar el tamaño celular como función de la velocidad de crecimiento, no son del todo conocidos.

Así, basándonos en el modelo de acoplamiento entre la velocidad de crecimiento celular y el control del tamaño celular, la velocidad de crecimiento sería comunicada al ciclo celular mediante el nivel de la chaperona Ydj1 libre, el cual juega un papel crucial en la determinación de la velocidad a la cual las moléculas de Cln3 son plegadas para activar *START* (Aldea et al., 2017). Y con todo ello, cabría pensar que mecanismos similares podrían relacionar la velocidad de crecimiento con otros procesos celulares que necesiten ser escalados con el tamaño o al potencial de crecimiento de la célula.

5.3. Necesidades para el crecimiento de la yema en levaduras (fases S-G2)

Se sabe que la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* presenta una disminución de la relación área superficial/volumen conforme avanza el tiempo y crece de tamaño la célula en G1. Y que justo en el momento de la gemación, a partir de la cual la célula muestra un crecimiento polarizado desde la célula madre hacia la yema naciente, hay un brusco cambio de esta ratio, aumentando en los primeros estadios de crecimiento de la yema (fase S del ciclo celular). Es en ese preciso instante, tras la gemación o inicio de la aparición de la yema, cuando se observa la existencia de un máximo en la velocidad de crecimiento del área superficial total de la célula.

Por ello, cabe esperar la necesidad de un aumento en la velocidad de síntesis de la superficie celular, en la cantidad de componentes y materiales (lípidos y proteínas) que llegan a la membrana plasmática, para el óptimo crecimiento de la nueva yema, así como la necesidad de un correcto crecimiento polarizado y transporte vesicular de todo ello desde la madre al lugar de la gemación (Mazel, 2017). La membrana plasmática tiene que cumplir un amplio rango de funciones biológicas, incluyendo la ingesta selectiva de sustancias, la transducción de señales y la regulación de la forma y la polaridad celular (Schuberth and Wedlich-Söldner, 2015).

¿Por qué las células necesitarían un mecanismo para especificar y definir sus tamaños? Para ciertas células, hay una clara asociación entre la función de una célula y sus dimensiones. Pero debido a que las células llevan a cabo multitud de procesos, dicha función es difícil de definir y su eficiencia de cuantificar. Además, el tamaño no ha sido demasiado investigado, y la literatura que relaciona el tamaño con el comportamiento celular es escasa (Ginzberg et al., 2015).

Relacionado con ello, cabe señalar que varias investigaciones sugieren un interesante enlace entre la regulación de la variabilidad del tamaño celular y la patología del cáncer. Mientras el cáncer es una enfermedad de una proliferación desregulada, en histología clínica es el tamaño de las células del cáncer quien hace tener una apariencia diferente a los tejidos que les rodean (Kufe et al., 2003). Las células de tumores malignos suelen ser más grandes y variables en tamaño que las células normales. Así, nos podríamos preguntar si una desregulación del tamaño celular tendría implicaciones en la tumorigénesis.

Por todo ello, y teniendo en cuenta que el tamaño crítico o celular en *START* está determinado por la velocidad de crecimiento del volumen en G1 (Ferrezuelo et al., 2012), postulamos la hipótesis de que dicha determinación del tamaño celular tendrá importantes implicaciones en el óptimo crecimiento de las células en las fases S-G2-M del ciclo celular, así como en el desempeño de sus funciones. Pues después de *START* es cuando la célula empezará a gemar, pasando del anterior crecimiento isotrópico en G1 a un crecimiento polarizado durante las fases S-G2. Este cambio en el crecimiento, así como otros procesos vitales como la replicación del DNA, y junto a la alta demanda en proteínas de membrana y de la pared celular necesarias para dicho crecimiento, nos podría hacer pensar que el tamaño de la célula es determinado para un eficiente crecimiento de la yema.

II. Objetivos

Las células hijas de levadura de gemación determinan su tamaño crítico en START, justo antes de la entrada al ciclo celular. A partir de ese momento, las células inician la gemación, mediante un crecimiento polarizado de la yema, y la replicación del DNA, así como otros muchos procesos moleculares esenciales para las siguientes fases del ciclo celular.

El propósito de la presente tesis fue el de aclarar y responder a la cuestión ¿para qué determinan las células su tamaño? Para ello, los objetivos de la tesis fueron:

- Estudiar los efectos de la determinación del tamaño crítico sobre la velocidad de crecimiento en las fases S-G2
- Analizar las implicaciones del volumen celular en los procesos moleculares relacionados con el crecimiento polarizado en las fases S-G2
- Proponer un modelo con mecanismos moleculares que puedan explicar dichas observaciones y analizar su relevancia funcional

III. Metodología

1. Condiciones de cultivo y Medios

En general, las levaduras han crecido en incubadoras (*Multitron* o *Multitron Standard* de *Infors HT* o *MaxQ4000* de *Barnstead* a 180-200rpm) a 30°C, con una agitación de 180-200rpm en el caso de los cultivos líquidos. En el caso de las bacterias, normalmente han crecido a 37°C, aunque pueden hacerlo a 30°C. Los medios de cultivo se han preparado según lo indicado en los manuales a partir de los componentes en forma seca:

YP: Medio rico para el crecimiento rutinario de levaduras para metabolismo fermentativo. Contiene un 2% de peptona (*Pronadisa*) y un 1% de extracto de levadura (*Pronadisa*). Como fuente de carbono podemos escoger glucosa (*Sigma*), rafinosa (*Sigma*) o galactosa (*Sigma*) al 2%, siendo entonces YPD, YPRaf o YPGal. Puede llevar G418 (*Duchefa*), clonNAT (*Werner BioAgents*) o HigromicinaB (*Sigma*) como agentes seleccionadores a una concentración de 200µg/ml (300µg/ml en el caso de la HigromicinaB).

SC: Medio completo y sintético para el crecimiento selectivo de levaduras. Contiene un 0.67% de *Yeast Nitrogen Base* con sulfato de amonio y sin aminoácidos (YNB, *Difco*) y un 0.06% de una mezcla de bases nitrogenadas y aminoácidos excepto aquellos para los cuales tengamos que seleccionar (*CSM*, *MP Biomedicals*). Podemos escoger como fuente de carbono glucosa (*Sigma*), rafinosa (*Sigma*) o galactosa (*Sigma*), al 2%, siendo entonces SCD, SCRAf o SCGal.

LB: Medio para el crecimiento de bacterias. Contiene un 1% de triptona (*Pronadisa*), 1% de NaCl (*Sigma*) i 0.5% extracto de levadura (*Pronadisa*), ajustado con NaOH a pH 7.5. La ampicilina (*Sigma*) para seleccionar cepas portadoras de plásmido está a una concentración de 25µg/ml.

Los componentes se pesan, se añade el agua mili-Q que corresponda y se esterilizan con autoclave a 121°C durante 15min. Los medios sólidos contienen además un 2% de agar (*Pronadisa*). Cuando aún está caliente y líquido, se añaden unos 20ml en placas bacteriológicas de 100mm. Algunos componentes sensibles, como los antibióticos, se añaden después de la esterilización cuando los medios están a unos 60°C.

Cuando se usaron las células BF305, en un cultivo de glucosa, éstas no expresan ninguna ciclina de G1, por lo que no pueden entrar en ciclo y solamente crecen en volumen, no se dividen. Cuando se pasan a un medio con galactosa (y libre de glucosa), se activa el promotor inducido por galactosa y se produce la expresión de Cln3, con lo que ahora las células sí que podrán empezar a gemar y dividirse. Con lo que, teniendo las células a diferentes tiempos en glucosa, obtendremos diferentes tamaños celulares antes de pasar la gemación.

2. Construcción de cepas de levadura

2.1. Cepas previamente construidas

En nuestro estudio se incluyeron cepas salvajes o modificaciones de éstas ya pertenecientes al laboratorio. Se utilizó la cepa salvaje CML128 (Casas et al., 1997) y sus derivadas CML128 mCherry, que incluye una copia de *TEFp-mCherry* integrada genómicamente. CML128 *whi5*, al que se le ha eliminado el gen *WHI5* mediante la interrupción con un casete *KANMX4*. También se utilizó la cepa salvaje BY4741 y sus derivados. Para el estudio con diploides se utilizó la cepa salvaje 1788 (Lee and Levin, 1992), el ancestro de CML128, para contrastar los resultados respecto a las mutaciones generadas. Y para los estudios de volúmenes muy grandes se utilizó la BF305 (Xiong et al., 1991)

2.2. Obtención de casetes de modificación genética

Para añadir un epítipo, cambiar el promotor o deleccionar genes de levadura, existen una serie de plásmidos diseñados de tal forma que mediante una PCR (*Polimerase Chain Reaction*) con unos cebadores de oligonucleótidos con una parte común y una parte variable, permiten producir grandes cantidades de unos fragmentos de DNA que contienen un gen de selección (y el promotor y/o epítipo si procede) y dirigirlo a la zona del genoma de la levadura que queramos (según la secuencia de la parte variable de los cebadores), tal como está descrito (Janke et al., 2004). Estas PCRs se han hecho en un termociclador *MyCycler* (*BioRad*), utilizando la DNA polimerasa *Phusion* HF (*Thermo Scientific*), normalmente en un volumen de reacción de 50 o 100 μ l con 0.5 μ M de cada cebador, 0.2 mM de una mezcla de *dNTPs*, 50 ng de DNA i el tampón suministrado por el fabricante. En general, el programa de PCR consistía en una primera desnaturalización a 98°C durante 30 segundos, seguida de 30 ciclos de 15s a 98°C, 20s a 60°C (anillamiento) y 1-2min (según el tamaño del producto esperado) a 72°C (elongación), para hacer posteriormente una elongación final de 10min a 72°C. Posteriormente se comprueba si la PCR ha funcionado y su rendimiento ha sido el correcto, en un gel de agarosa (*Lonza*) al 0.8% con tampón TAE 1X (40mM Tris, 20mM ácido acético y 1mM EDTA) unos 3-5 μ l de la reacción, a 100-150V hasta que el frente avance lo suficiente. Después de la carrera teñimos el gel con bromuro de etidio 0.5 μ g/ml disuelto en TAE1X durante unos 20min, y se lee el resultado excitando el gel con luz UV y capturando la fluorescencia en el rango de los 600nm con un equipo de documentación de geles (*GeneGenius*). Si el resultado es el esperado, se limpia el producto de reacción mediante un kit de *clean up* (*Macherey-Nagel*) siguiendo el protocolo del fabricante, para eliminar las sales y los oligonucleótidos de la reacción de PCR; en resumen consiste en mezclar el producto de PCR con un agente caotrópico, y pasar la mezcla por una columna donde se une el DNA, donde se hacen lavados con un tampón que contiene etanol y finalmente se diluye en TE 1X (10mM Tris-HCl pH8 i 1mM EDTA).

2.3. Transformación de levaduras

Consiste en introducir DNA en forma de plásmido, de caset integrativo o de diversos fragmentos lineales que tendrán que recombinar homológamente para ver un nuevo plásmido circular en la cepa de *S. cerevisiae* deseada. Para una transformación necesitamos unas 5 OD₆₀₀ que estén creciendo exponencialmente a una concentración de entre 0.4-1OD/ml. Las células se limpian del medio con agua y se permeabilizan mediante el tampón TE/LiAc (Tris 10mM, EDTA 1mM, acetato de litio 0.1M, en agua), y se protegen en la mezcla de transformación (un volumen de 50µl) añadiendo 300µl del tampón PEG (Tris 10mM, EDTA 1mM, acetato de litio 0.1M i polietilenglicol al 40%). Para mejorar la eficiencia de entrada de DNA se cotransforma con 5µl de ssDNA (DNA de cadena simple proveniente de esperma de salmón), junto con un volumen adecuado del DNA a introducir (unos 50ng para plásmidos, 600-800ng para casets y unos 200ng de cada fragmento lineal cuando se quiere construir un nuevo plásmido por recombinación homóloga). La mezcla de DNA+células+tampón TE/LiAc/PEG se incuba 30min a 30°C, y posteriormente se provoca un choque térmico a 42°C durante 15min. Después se centrifugan las células y se resuspenden en 50µl de agua para plaquearlas en medio selectivo. Este plaqueo se realiza inmediatamente si la selección es por auxotofía, o después de 4 horas de recuperación en YPD si la selección es mediante antibiótico, para dar tiempo a que los genes de resistencia se expresen.

El término 'OD', que proviene de las siglas en inglés de densidad óptica, lo utilizamos tanto para hablar de la concentración de un cultivo líquido con las células en suspensión como para referirnos al número total de células. Por ejemplo, nos referimos a concentración celular cuando hablamos de un cultivo a 0.5 OD/ml, mientras que hablaremos de número total de células cuando hablamos de recolectar 5OD₆₀₀. De manera rutinaria usamos como medida esta densidad óptica porque la podemos medir fácilmente con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600nm (así que lo que medimos realmente es la OD₆₀₀ del cultivo), mientras que contar número de células es más lento y complicado. Para células de levadura estándar, la relación entre número de células y OD₆₀₀ es: 1OD=2·10⁷ células. Es decir, que un cultivo con una concentración de levaduras de 2·10⁷cfu/ml nos dará una densidad óptica de 1 a una longitud de onda de 600nm.

2.4. PCR de colonia

Para comprobar si las colonias que aparecen en la placa después de la transformación han adquirido correctamente el DNA que hemos introducido, podemos hacer una PCR de comprobación directamente desde la colonia. El procedimiento es simple: se pica la colonia en cuestión con una punta, la punta se introduce en un tubo de PCR para dejar algunas células y posteriormente se ralla una placa selectiva con la punta para obtener más cantidad de colonias de aquel clon. Después preparamos la mezcla de reacción: para cada tubo, con un volumen final de 20µl, mezclamos 2µl de tampón 10X, 2µl de dNTPs, 0.2µl de cada cebador y

0.2µl de *Suprathem Taq* DNA polimerasa (*GeneCraft*), llegando a 20µl con agua (también se utilizó la polimerasa *DreamTaq DNA polymerase* de *ThermoFisher Scientific*, con su correspondiente tampón, resultando igualmente válida). Los tubos con las células dentro se ponen 2min en el microondas para hacerlas explotar y que liberen el DNA, e inmediatamente después se añaden los 20µl de mezcla y se pone al termociclador. El programa de PCR, por norma general, consiste en 2min a 94°C, 35 ciclos de 15s a 94°, 30s a 55°C (el anillamiento, según la secuencia de los cebadores, puede cambiar) y de 30s a 2min (según el tamaño del producto esperado) a 72°C (elongación), con 5min de elongación final a 72°C. Posteriormente se cargan 10µl de reacción en un gel de agarosa del 0.8-2% (según la medida del producto esperado) para comprobar si aparece la banda esperada. Es muy recomendable incluir controles negativos y si se puede también controles positivos (ya que a veces la PCR no funciona y si no, no sabremos si el motivo es porque las colonias son todas negativas o simplemente porque el procedimiento no ha salido bien). Cuando estamos integrando casets en el genoma, disponemos de un cebador universal reverso dentro del caset en el extremo 5', así que sólo tenemos que diseñar otro directo unos 300-600 pares de bases antes del lugar teórico de inserción. Si la PCR es positiva y tiene el tamaño esperada, es que el caset está donde tendría que estar. Si no es así, los cebadores estarán demasiado lejos el uno del otro (o incluso pueden estar en cromosomas diferentes) y la PCR será negativa.

2.5. Extracción rápida de DNA genómico de levadura

Si necesitamos amplificar un fragmento grande de DNA por PCR, la aproximación de PCR desde la colonia no dará un rendimiento adecuado, por lo que se ha de purificar DNA con mejor calidad. Para poder obtener DNA genómico de buena calidad, se parte de 5ml de YPD de un cultivo estacionario de la cepa de levadura de la cual se quiere extraer DNA genómico. Se centrifugan las células a 5krpm, 2 min, y se rompen con bolas de vidrio (*Sigma*) y con 200µl del tampón TNEST (Tritón X-100 2%, NaCl 0.1M, EDTA 1mM, SDS 1% y Tris-HCl pH8 10mM) en la *FastPrep (MP Biomedicals)* haciendo 3 ciclos de 30s a 5m/s o 10min en el vortex (si queremos obtener genómico con los cromosomas prácticamente íntegros). Se añaden 200µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y 200µl de TE, se mezcla todo con el vórtex y se centrifuga 5min a máxima velocidad. Se recupera la fracción acuosa (unos 400µl) y se precipita el DNA añadiéndolo a un tubo con 1ml de etanol 100% (*PanReac*). Se centrifuga la mezcla, se elimina el etanol y se resuspende el pellet (que contiene el DNA) con 400µl de TE, donde se añaden 13.3µl de NaOAc 3M (*Sigma*). Se mezcla y se vuelve a hacer precipitar añadiendo 1ml de etanol 100%. Se centrifuga 2min a máxima velocidad, se elimina el etanol, se lava el pellet con 1ml de etanol 70%, se vuelve a centrifugar y eliminar el etanol, y finalmente se secan los últimos restos de etanol con un concentrador de vacío (*Eppendorf*) y se resuspende el DNA con 100µl de TE. Si queremos eliminar el RNA, añadimos 1µl de RNasaA 10mg/ml (*Sigma*) y lo incubamos 5min a 37°C.

3. Construcción de plásmidos y clonaje de genes

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

3.1. Clonación de genes y vectores receptores

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

3.2. Construcción por recombinación homologa

El protocolo que se usó está basado en (Joska et al., 2014). Los genes de interés se amplificaron con 15pb de homología, en los extremos, al lugar de integración en nuestro vector receptor. Los vectores se prepararon por digestión mediante enzimas de restricción o por amplificación para dotar de los mismos extremos homólogos. Se transformaron 200ng del inserto de interés y 100ng de vector la cepa de levadura CML128. Tras una selección mediante el marcador auxotrófico procedente del vector se hizo crecer las colonias resultantes de la transformación en 2mL medio selectivo, de 1 a 3 colonias independientes. El plásmido se extrajo mediante el *kit Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II (Zymo Research)* en un volumen final de 10µL y finalmente se transformó en células competentes de *E. coli* DH5α.

3.3. Transformación en células competentes de *E. coli* DH5α

Una vez hecha la ligación, la tenemos que transformar en *E. coli*. Tenemos alícuotas de células competentes de la cepa DH5α comerciales (*Invitrogen*), que tenemos guardadas en el congelador de -80°C. Cogemos y ponemos en gel tantas alícuotas como transformaciones tengamos que hacer y ponemos 5µl de la reacción de ligación en el tubo con las células, lo mezclamos con el dedo y lo dejamos 30min reposando dentro del gel, dejando que el DNA se ponga sobre las células. Posteriormente hacemos un choque térmico de un minuto a 42°C, para forzar la entrada del DNA dentro de las células; después se añade 1ml de LB sin antibiótico dentro del tubo, y se deja incubando 1h a 37°C, de tal manera que, si alguna célula ha adquirido DNA, tenga tiempo a expresar el gen de resistencia a ampicilina que incluía la

construcción. Pasada la hora de incubación, se centrifuga el tubo 2min a 3000rpm, se elimina la mayoría del volumen de LB y con el que queda se resuspende el pellet de células y se plaquea en una placa de LB-Amp. Se pone en el incubador de 37°C y al día siguiente (16h) han de aparecer colonias que lleven el nuevo plásmido que hemos construido.

3.4. Extracción rápida de plásmidos para su comprobación (*Jet Preps*)

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

3.5. Extracción de plásmidos para su utilización (*Mini Preps*)

Se parte desde un cultivo crecido toda la noche a 37°C en 2-3ml de LB líquido con ampicilina o de una placa de LB fresca con colonias confluentes, también con ampicilina. Se pasan unos 50µL células a un *ependorf* y a partir de aquí se siga el protocolo indicado en el kit de *miniprep* (*Macherey-Nagel*). En resumen, se hace una lisis alcalina en presencia de SDS de las bacterias, seguida de una neutralización, y el sobrenadante se pasa por una columna donde se une el DNA, y allí se pueden lavar las impurezas con tampones que contienen etanol y finalmente eluirlo en TE 1X. Algunos plásmidos dañan las bacterias cuando éstas crecen muy deprisa, y en este caso las hacemos crecer más lentamente a 30°C o a temperatura ambiente. Normalmente, se suele obtener una concentración final de 200-600ng DNA/µL en 80µL H₂O. El vector se analizó mediante digestión por enzimas de restricción y electroforesis en geles de agarosa 0.8% en *buffer* TAE para confirmar la correcta construcción del vector.

3.6. Obtención de DNA plasmídico a partir de levadura (*Zymoprep*)

Una vez obtenidas las colonias de una transformación (y si es posible, después de comprobar que contienen la construcción deseada para una técnica rápida como microscopia de fluorescencia o PCR de colonia), podemos extraer el DNA plasmídico de la levadura y pasarlo a *E. coli*, para después poder obtener en grandes cantidades haciendo una *miniprep* normal. Para hacerlo, dejamos crecer durante una noche las levaduras en medio selectivo por el vector en cuestión a 30°C (cultivos de 2ml si lo hacemos en líquido, o lo podemos hacer directamente desde colonia si dejamos que esta se haga suficientemente grande, pasamos las células a un eppendorf y las separamos por centrifugación; a partir de aquí seguimos el protocolo del kit de *Zymoprep* (*Zymo Research*). Resumiendo, se resuspenden las células en un tampón que contiene zimoliasa (una mezcla de proteasas que elimina la pared celular de las levaduras) y se incuba la mezcla 1h a 37°C. Después se hace una lisis alcalina con SDS, neutralización y unión a columna (parecido a la *miniprep*), donde se limpia el DNA y finalmente se elude con 10µl de agua. La totalidad de todo el eluido se transforma directamente en DH5α para obtener clones de bacteria que lleven el plásmido.

4. Técnicas de Microscopia *in vivo*

4.1. Enriquecimiento de células de primer ciclo (gradientes de Ficoll)

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

A partir de cultivos en exponencial de las cepas de interés se recuperaron 20 OD₆₀₀, y se centrifugaron a 2500rpm 2min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* con 1mL de PBS estéril. Las células se lavaron previamente con 20mL H₂O MQ si el cultivo procedía de medio YPD o YPGal, y se colocaron sobre los gradientes de Ficoll inclinando también los tubos para evitar una mezcla excesiva. Con la ayuda de una micropipeta se rompió la interfase generada por las células y el gradiente, y se centrifugaron los tubos a 1250rpm 6min a temperatura ambiente. Se recuperaron 0.5-1mL de la fase superior de las células, se transfirió a nuevos tubos de 1.5mL que se centrifugaron a 2500rpm 2min. El sobrenadante se eliminó y se resuspendió el *pellet* en 0.1mL de PBS frío. Se confirmó un nivel menor del 30% de células en gemación mediante microscopia (*Zeiss PrimoStart*). Seguidamente, las células se procesaron según nuestro interés experimental, esperando 90min (glucosa) o 120min (galactosa) para obtener un porcentaje de gemación superior al 90%.

4.2. Preparado y fijado de las células

Se cogió entre 0.5-1mL de cultivo asincrónicos procedentes de medios SC con 0.3-0.8 OD₆₀₀ o YPD 0.5-1.5 OD₆₀₀, se centrifugaron a 5000rpm 2min y se concentraron en una gota de 30μL de medio SC o PBS. La gota se depositó sobre un portaobjetos o cámara de cultivo (para microscopía *time-lapse*). Para unir las células al cubreobjetos, hemos de recubrir el vidrio con Concanavalina-A 0.2mg/ml (Sigma) durante 20min y después lavar el vidrio con agua y medio. La Concanavalina-A se une a polisacáridos de la pared celular de la levadura y evitará que las células se muevan durante la adquisición de imágenes. Las células se dejan reposar sobre el vidrio durante 3-5min, se retiran los sobrantes y se monta el cubreobjetos en el portaobjetos, o se cubre con 300μl de medio de cultivo SC en el caso de cámaras de cultivo (nunca utilizar YP).

4.3. Obtención y análisis de imágenes por microscopía

La adquisición se ha hecho preferentemente en un microscopio de campo amplio motorizado, automatizado e invertido (Leica AF7000) con un objetivo de 63x/1.3NAe inmersión en aceite y una cámara CCD ORCA-R2 (*Hammamatsu*), aunque por problemas de disponibilidad, también hicimos uso de un microscopio de campo ancho más sencillo (Nikon E600) con un objetivo de 60x/1.4NA e inmersión en aceite y una cámara DP72 (*Olympus*).

Los datos del volumen celular se obtuvieron de imágenes de campo claro para luz transmitida (Ferrezuelo et al., 2012). En el caso de las imágenes para la fluorescencia se utilizaron los cubos de filtros fluorescentes, filtros externos de excitación y emisión siguientes: para la señal GFP: eGFPselectivo, (482/8), (520/28); y la señal mCherry: (572/35), (640/50).

Las imágenes se han procesado con el *plug-in* para *ImageJ* llamado *BudJ* (Ferrezuelo et al., 2012), que determina el límite óptico de las células a partir de la imagen en campo claro (hay un fuerte cambio de grises en el límite de la célula), calcula el centro del elipsoide y sus radios mayor y menor, y a partir de ahí calcula el volumen según la ecuación $V=4/3 \cdot \pi \cdot R \cdot r^2$ correspondiente a un prolato, que es la forma que tienen las levaduras (forma ovalada).

4.4. Determinación del volumen de gemación de levaduras en cultivos exponenciales

La forma más precisa para determinar si afecta la progresión de la célula hacia la activación del ciclo celular, siempre que no haya problemas graves de crecimiento es determinar el tamaño de gemación a través de imágenes fijas en campo claro de cultivos creciendo exponencialmente, que es una buena aproximación a la determinación de la medida

crítica de *START* (que se define por el momento en que Whi5-GFP sale del núcleo, y se ha de determinar por microscopía de fluorescencia y *time-lapse* (Ferrezuelo et al., 2012)) ya que la aparición de la yema se puede ver directamente en el campo claro, sucede inmediatamente después de la salida de Whi5 del núcleo y una vez la yema aparece, la célula madre no crece más ya que toda la producción se envía a la célula hija (Ferrezuelo et al., 2012), por lo que midiendo el volumen de las células gemadas, realmente estamos midiendo el volumen que tenían justo en el momento que habían gemado.

4.5. Medida de competición celular (*fitness*)

Para responder a ello, nos propusimos realizar un experimento de “competición celular”, inoculando en un mismo cultivo a dos tipos de levaduras de gemación diferentes y observando que población predominaría con el paso del tiempo. Así, llevamos a cabo tres cultivos o competiciones diferentes: wt vs wt o *whi5* o *cln3*. Para poder diferenciar cada tipo de célula dentro de un mismo cultivo, insertamos en el wt el gen GFP bajo el promotor constitutivo TEF, mientras que en el otro wt, así como en *whi5* y en *cln3*, insertamos el gen de mCherry. Partiendo de cultivos en exponencial de cada una de las cepas por separado, se inocularon el correspondiente número de células de cada uno para empezar la competición con el 50% para cada tipo. Todas las competiciones fueron llevadas a cabo por duplicado, incubadas a 30°C y a 180rpm. Y cada 24 horas se tomaban muestras, se cuantificaba el número de células de cada tipo mediante microscopía de fluorescencia (AF7000, 63x), y finalmente se realizaban diluciones de cada cultivo hasta una OD₆₀₀ de 0.002, para que pudiesen seguir creciendo en un medio completo y rico en glucosa sin problemas.

$$\text{Número de generaciones}(n): O.D._{600,f} = O.D._{600,i} * 2^n$$

4.6. Microscopía multiposición *time-lapse*

Para hacer microscopía *time-lapse* durante unas horas (entre 3-6 horas), las células se plantan en cámaras de incubación de 35mm con un fondo de vidrio (GWST-3522, WillCo), previamente tratadas con Concanavalina-A (*Sigma*) y después llenas con 300µl de medio basado en SC, adquiriendo las imágenes en el microscopio AF7000 (objetivo de 63x/1.3NA de inmersión en aceite, y una escala de 0.1023µm/pixel) cada 2-5min (en función de la resolución temporal que requiera la medida y/o de lo que tarde en adquirir las imágenes en todas las posiciones fijadas) e incubando a 30°C durante todo el experimento, gracias al uso de un soporte especial (*PeCon Microscope Incubator BL*) con regulador de temperatura. En cada campo y en cada fotograma se autoenfoca según un algoritmo integrado en el software que controla el microscopio.

4.7. Determinación de la velocidad de crecimiento de las levaduras de gemación

Para el estudio de las velocidades de crecimiento, se aplicó el *pluggin BudJ* a las imágenes obtenidas por *time-lapse* (cada 3min), representándose la variación del volumen celular. Se usaron cultivos creciendo a 30°C. Para el estudio en G1, se utilizó *ficoll* para seleccionar las células más pequeñas (de primer ciclo).

La velocidad de crecimiento de la célula madre antes de la gemación se calculó mediante la pendiente de una regresión lineal para los últimos 45min (α), o lo que es lo mismo, la velocidad de crecimiento en G1. La velocidad específica de crecimiento en G1 la calculamos dividiendo la velocidad de crecimiento entre el volumen celular de estudio, esto es, el volumen inicial al cual medimos dicha velocidad. Para mostrar grandes cantidades de datos, usamos los *bins* o agrupaciones de puntos (células) por intervalos de volumen.

Para el cálculo de la velocidad específica en S-G2, se procedió de manera similar a lo realizado para G1, pero ahora aplicado a la yema. En esta ocasión, mediante la cinética de crecimiento en volumen de la yema y la regresión lineal de ésta para los 30 minutos siguientes a la gemación, se obtuvo una nueva pendiente (β) o velocidad de crecimiento en S-G2. Calculamos la velocidad específica de crecimiento de la yema (S-G2), dividiendo su velocidad de crecimiento entre el volumen de gemación (el volumen de la célula madre en gemación).

4.8. Velocidad de transporte de vesículas desde la célula madre hasta la yema

Para ello, fusionamos en diferentes cepas de levadura la proteína fluorescente GFP o a Myo2 o a Sec31 en C-Terminal, y pasamos a medir la velocidad de transporte (específica) de cada uno de ellos desde la célula madre hasta la yema tanto para el wt como para los diferentes mutantes con tamaños celulares menores y mayores que éste.

Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal de escaneo LSM780 (Zeiss), con el objetivo de 63x/agua, *pinhole* de 51.3 μ m (1U.A.), 0.084 μ m. Se usó la técnica de FRAP (recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo), realizando para el fotoblanqueo 60 irradiaciones a una potencia de 500 del láser 488nm.

Con las células en crecimiento exponencial, asincrónicas, para tener la mayor diversidad en tamaño de la madre. En SDC. Las células las seleccionábamos que estuvieran gemando y aisladas. Realizamos el fotoblanqueo en toda la yema (tiempo "0") y fuimos tomando imágenes cada 2 segundo durante 45 ciclos para ver la recuperación de la fluorescencia, gracias al envío de vesículas desde la madre. A la intensidad de fluorescencia media de la yema, le restamos la fluorescencia de fondo (fluorescencia neta) y la autofluorescencia de las células homólogas sin expresión de GFP. Para calcular la velocidad de transporte, medimos la

pendiente(m) en la gráfica de la cinética de recuperación de fluorescencia con el tiempo mediante la ecuación siguiente:

$$\text{Fluorescencia} = m * \ln(\text{tiempo}) + b$$

Para calcular la velocidad específica de transporte, dicha “m” la multiplicamos por el volumen de la yema (Vd, para obtener la fluorescencia total de ésta) y la dividimos por el volumen de la madre (Vb, para hacerlo específico al volumen):

$$\text{Velocidad específica de transporte} = (m * Vd) / Vb$$

Cada valor lo relativizamos con respecto a la media del conjunto de células control. En los experimentos en los que se quiso desnaturalizar el citoesqueleto y los cables de actina, se hizo uso de Latrunculin-A (LatA) a 200µM, en DMSO. Usándose la misma concentración de DMSO para las células control.

4.9. Cuantificación del número de cables de actina

Para ver los filamentos o cables de actina, marcamos con un fluoróforo la proteína ABP140 (*Actin binding protein 140*), la cual se intercala entre los monómeros que forman la estructura de los cables de actina. Ello lo hicimos tanto en células wt haploides como en diploides CML, como en las células BF305, tanto creciendo en Galactosa (crecimiento exponencial), como paradas 2/4/6/8h en Glucosa, y puestas otra vez en Galactosa hasta que empiezan a gemar. Cogí las células con una gema más o menos pequeña ($Vd < 16$).

Obtuvimos imágenes de todas las células durante la gemación por microscopía confocal con el LSM780 (ZEISS, objetivo 63x, agua, NA 1.3, TA, 0.084µm/píxel, 8 bits, *pinhole* 51.3 (1UA), laser 488nm). Las imágenes de fluorescencia GFP fueron obtenidas cada 0.5µm a través del eje z, a lo largo de toda la célula (un rango de 6µm, divididos en 13 cortes, de abajo hacia arriba), durante 4min/*scan*. Tras realizar una deconvolución de todas las imágenes de una misma célula, realizamos una reconstrucción en 3D y su proyección para poder contabilizar fácilmente todos los filamentos de actina que iban desde la célula madre hasta la yema.

4.10. Determinación de la concentración y localización de proteínas

Cuando queremos estudiar proteína determinada a nivel de célula individual bajo el microscopio lo hacemos en forma de fusión a una proteína fluorescente (GFP (Heim et al., 1995) o mCherry (Shaner et al., 2004)), así que podemos seguir su estado dentro de la célula por microscopía de fluorescencia. Las células se montan en el cubreobjetos como se explicó anteriormente y la adquisición se hace preferentemente con el equipo AF7000 (*Leica*), objetivo 63x/1.3NA de inmersión en aceite y con el juego de filtros y dicroicos adecuado, capturando las imágenes con una profundidad de píxel de 16bits. Una vez tenemos las imágenes, usamos una extensión del *plug-in* BudJ, que después de determinar los límites de

la célula con el canal de campo claro, busca en el canal de fluorescencia dentro aquel elipsoide. Como un microscopio de campo ancho capta toda la fluorescencia que emite la levadura, podemos determinar la concentración citoplasmática de cualquier proteína mediante el valor medio de fluorescencia dentro de la célula (restando primero la autofluorescencia de las células y la fluorescencia emitida por el fondo, calculada como la moda de todo el campo), para las células grandes. Esos valores los hicimos relativos al control Cdc28 y a las células pequeñas creciendo todo el rato exponencialmente (en galactosa).

5. Análisis de RNAseq

Usamos las células de levadura BF305, reteniéndolas en glucosa durante 1.5h y 8h en glucosa, para tener dos tipos de muestras que hayan pasado por glucosa y para obtener unas muestras de células pequeñas (unos 45fL, 1.5h en glucosa, muestras "S") y otra muestra de células grandes (500fL, 8h en glucosa, muestras "L"). Tras ello, pasamos las células a galactosa para que empezaran a gemar, y cuando el 50% de las células estaban gemando (unas 2h), procedimos a extraer sus RNA.

5.1. Extracción de RNA

Cada una de las muestras anteriores la repetimos por triplicado, a partir de cultivos independientes.

La extracción de RNA se realizó según el método de purificación mediante etanol. Sobre unas 25 OD₆₀₀ de células se recolectaron mediante centrifugación (2500rpm, 2min). Se lavó el *pellet* con 5ml de agua fría y se volvió a centrifugar. Se resuspendieron las células en 25µl de TE y 25 µl de fenol ácido. Tras 2min de incubación a 60°C, se añadieron bolas de vidrio (Sigma) para romper las células usando la *FastPrep* (MP *Biomedicals*) durante 30seg a velocidad 4m/s. A continuación, se añadieron 0.5ml TES y 0.5ml de fenol ácido. Tras 30seg de agitación, se incubó la mezcla 15min a 60°C. Se volvió a agitar por 30seg y se realizó otra incubación en hielo durante 5min. Se procedió con una centrifugación de 5min a 12krpm, se cogió 0.5ml del sobrenadante y se le añadió 0.5ml de cloroformo. Ello se agitó por 30seg y se centrifugó de nuevo 5min a 12krpm. Tras ello, se cogieron 0.4ml del sobrenadante, se le añadieron 40µl de NaOAC 3M pH5.2, 1ml de etanol puro, y se incubó 15min en hielo. A continuación, se centrifugó por 5min a 12krpm, se lavó el *pellet* con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 50µl agua libre de RNAsa.

Para comprobar la calidad del RNA se midieron las OD₂₆₀ y OD₂₈₀ mediante espectrofotometría (*Nanodrop*). La integridad del RNA la medimos mediante electroforesis en gel de agarosa.

5.2. Secuenciación y análisis de datos RNAseq

Las muestras las enviamos a la empresa “*LC Sciences*” para que las secuenciasen según la metodología *Illumina*:

preparación de la librería → generación de un clúster → secuenciación → análisis de datos

Una vez tuvimos los datos de la secuenciación en formato FASTQ, con *RobiNA* realizamos un control de la calidad y una limpieza de los *reads*.

Usamos datos relativizados. No sabemos el número de moléculas por célula o por volumen o por concentración. Normalizamos cada muestra por ella misma. FPKM: fragmentos o *reads* per kilobases and mega *reads* (por total de millones de *reads*). Cada experimento tenía unos 10 millones de *reads*. Y luego, otra etapa de normalización, cada dato es dividido por su longitud, porque los genes largos tendrán más *reads*. Y así luego sacamos el \log_2 . Para tener ratios, tenemos que restar desde las medias. Y también tenemos un *p-value*, para ver si esas medias o las ratios son significativos.

Lo que hacemos con el *Perseus* es agrupar para hacer estadísticas. Los scores que salen de aquí y su validación son para las muestras que tenemos, las cuales son relativamente sencillas, pues son tres muestras repetidas de células pequeñas y tres de células grandes. Y les realizamos un t-test. La cuestión consiste en que a partir de los *reads* podemos crear un score dado. Obtenemos unas matrices, a las cuales les realizamos ciertas operaciones como las de obtener el logaritmo, y a cuya nueva matriz la llamamos “Transformación”.

Pasos seguidos con *Perseus*:

Clasificación de muestras (3xS y 3xL) → T-test → \log_2 → Ratio de \log_2 (L/S) → Reemplazar valores #NA → Visualización de resultados: PCA y *HeatMap* (*clustering*)

El análisis del enriquecimiento de categorías en genes más o menos expresados en las células grandes con respecto a las células pequeñas lo llevamos a cabo con GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) desarrollado por el *Broad Institute*. Para cada categoría se indicó el nombre y número de genes que la contienen, su valor de NES (*normalized enrichment score*) y la probabilidad FDR (*false discovery rate*).

6. Estudio estadístico

Para el estudio estadístico de los resultados de esta tesis se utilizó el paquete estadístico asociado al software *Microsoft Excel* (365), tanto para la obtención de medias, desviación estadística y límites de confianza como en la prueba *t-Student* para determinar diferencias significativas entre las medias de las muestras estudiadas.

IV. Resultados

1. Efectos de la determinación del volumen celular

Según datos obtenidos por miembros de nuestro grupo de investigación sobre el control de la entrada al ciclo celular, usando como modelo a levaduras de gemación, el volumen celular en START (final de la fase G1 del ciclo celular) depende de la velocidad de crecimiento (α) en G1 (Ferrezuelo et al., 2012). Una vez las células determinan su tamaño celular en START (Johnston et al., 1977), y si las condiciones lo permiten, éstas llevarán a cabo la gemación y continuarán por las siguientes fases del ciclo celular (fases S-G2-M) con ese mismo volumen para la célula madre determinado anteriormente (volumen de gemación o V_b). Con lo que, nuestro objeto de estudio fue conocer para qué necesitan las células determinar su volumen y las consecuencias de ello una vez pasado el momento de la gemación o la transición G1/S.

1.1. La velocidad específica de crecimiento en G1 no depende del volumen

Según la teoría del crecimiento exponencial, las células crecen proporcionalmente a su volumen o masa, es decir, la variación de dichas magnitudes en el tiempo es proporcional a su valor, lo que implica que crece más rápido en el tiempo cuanto mayor es. Pero para los volúmenes y espacio de tiempo en el cual las levaduras de gemación crecen, y se puede cuantificar, es válido considerar un comportamiento lineal del crecimiento en volumen, pues éste aumenta proporcional al tiempo.

En la **Figura 8A** mostramos el crecimiento de una levadura de gemación haploide, de la cepa BY4741, y en la **Figura 8B** representamos dicho incremento del volumen a lo largo del tiempo, de donde a través de una regresión lineal, y para los últimos 45 minutos antes de la gemación, sacamos la pendiente (α), o lo que es lo mismo, la velocidad de crecimiento en G1. Quisimos ver el comportamiento de ésta para cada instante, es decir, a cada volumen celular. La velocidad se mide en un periodo de tiempo y arbitrariamente se refiere al volumen inicial. El crecimiento o la velocidad, independientemente de la cinética que tenga, tiene que depender de la masa en ese momento.

Así, primero calculamos la velocidad específica o relativa a ese tamaño celular, dividiendo la velocidad de crecimiento entre el volumen celular de estudio, esto es, el volumen inicial al cual medimos dicha velocidad. Finalmente, representamos la velocidad específica de crecimiento (α/V) frente al volumen celular (V) (**Figura 8C**). Para mostrar grandes cantidades de datos, usamos los *bins* o agrupaciones de puntos (células) por intervalos de volumen (**Figura 8D**), porque existe una variabilidad en los datos debida a la velocidad de crecimiento, la cual no la estamos mostrando, pero sí que sabemos que el tamaño correlaciona y depende de la velocidad en G1. Una parte de esa variabilidad es inherente al sistema y, aunque no la consideramos de forma específica, sabemos que existe. Es por este motivo que hacemos uso de los bins, para poder manejar dicha variabilidad.

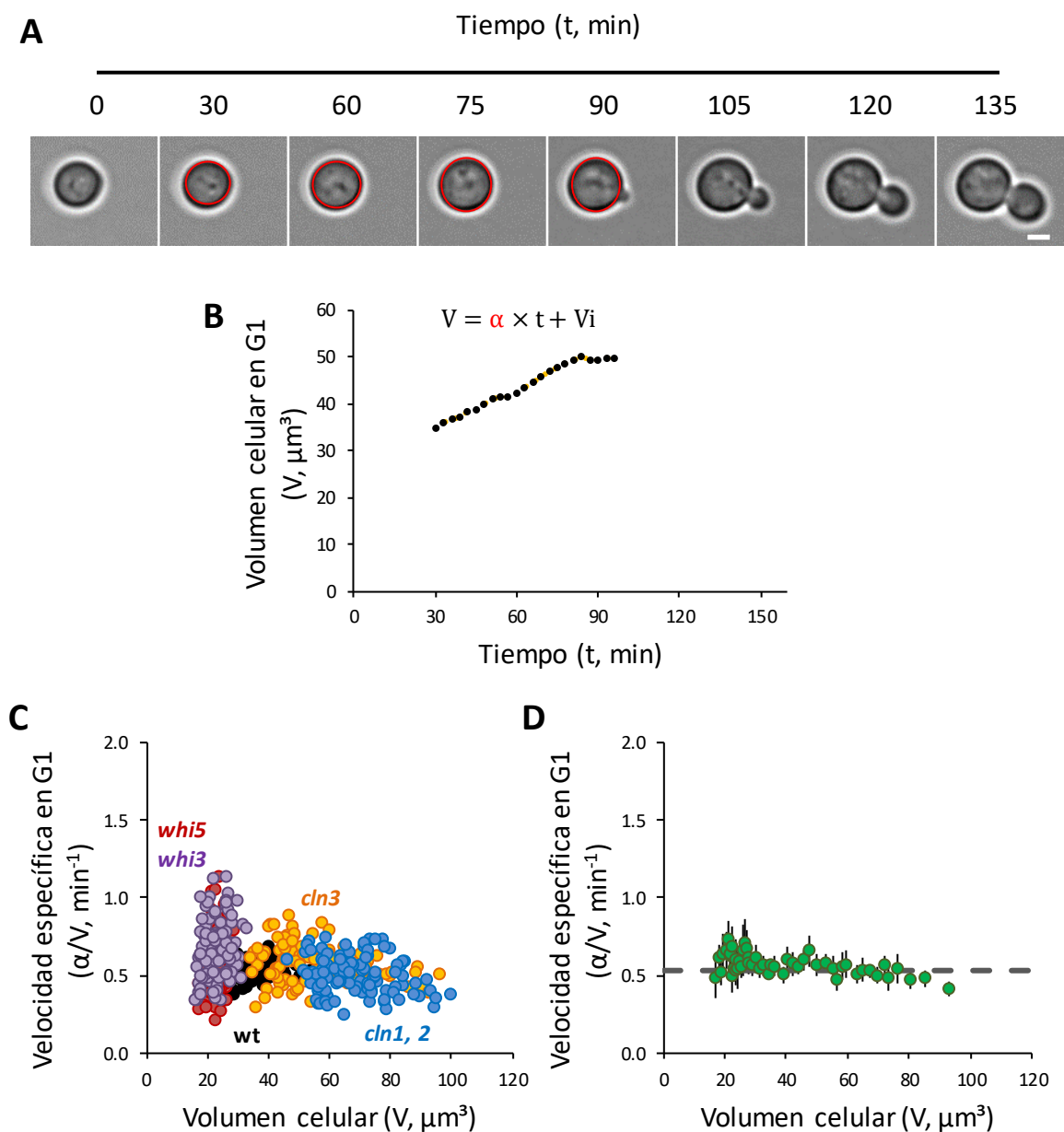


Figura 8: La velocidad específica de crecimiento en G1 no depende del volumen.

(A) Imágenes mostrando el aumento del volumen celular (V) a lo largo del tiempo. La barra indica una escala de 2 μm .

(B) Representación de la cinética de crecimiento en volumen para dicha célula. α es la velocidad de crecimiento en G1.

(C) Velocidad específica de crecimiento en G1 (α/V) frente al volumen celular para el wt y los diferentes mutantes de START. Cada punto representa una célula distinta. Para cada una de las muestras, $n=100$.

(D) Representación de todas las células en (C), agrupándolas en bins o intervalos de volumen cada 10 células. La línea de rayas grises indica el valor medio de la velocidad específica para las células wt de (C). Las barras de error indican el intervalo de confianza ($\alpha=0.05$).

Pudimos observar que tanto para las células con volúmenes menores a las células wt, a las cuales les falta alguno de los inhibidores o reguladores negativos de la entrada al ciclo celular (*whi5* y *whi3*), como para las más grandes, sin las ciclinas o activadores de START (*cln3* y *cln1,2*), esta velocidad específica de crecimiento en G1 permanecía constante, es decir, no

existía una dependencia de ésta con el volumen durante la fase G1 del ciclo celular, durante el crecimiento isotrópico.

Una vez comprobado esto, quisimos estudiar qué sucedía una vez las células de levadura de gemación habían alcanzado START y pasaban a la transición G1/S o la gemación. Se trataba de averiguar para qué determinaban las células su volumen en START, en un rango de volúmenes bastante delimitado, y las implicaciones en las siguientes fases del ciclo celular (las fases S-G2-M) para aquellas células fuera de dicho intervalo.

1.2. La velocidad específica de crecimiento en S-G2 decrece con el volumen

Primero de todo, y siguiendo con las observaciones anteriores, quisimos estudiar qué sucedía con la velocidad de crecimiento de las células durante las fases S-G2 una vez su volumen ya había sido determinado.

Mientras en los experimentos en G1 seguíamos el aumento del volumen de la célula hija con el tiempo hasta la gemación o entrada en ciclo, para estudiar velocidades de crecimiento en S-G2 debemos de monitorizar la evolución de la yema, pues a partir de START y tras la gemación, el volumen de la célula hija (V_b o volumen de gemación) permanece constante, siendo la yema o futura célula hija la única que aumenta en tamaño en estas etapas del ciclo celular y hasta su nacimiento tras la separación de la célula madre. Así, las levaduras de gemación pasan de un crecimiento isotrópico en G1, a un crecimiento polarizado en las fases S-G2.

Para el cálculo de la velocidad específica en S-G2, se procedió de una manera similar a lo realizado para G1, pero ahora aplicado a la yema. En la **Figura 9A** se siguió el crecimiento de la yema de la misma célula haploide representada en la **Figura 8A**. En esta ocasión, mediante la cinética de crecimiento en volumen de la yema y la regresión lineal de ésta para los 30 minutos siguientes a la gemación, se obtuvo una nueva pendiente (β) (**Figura 9B**).

Como anteriormente, se quiso ver el comportamiento de esta nueva velocidad para cada tamaño celular, o lo que es lo mismo, para cada volumen de gemación, pues es éste el volumen celular inicial del intervalo de tiempo para el cual medimos la velocidad de la yema, y si ese aumento en el volumen, correspondiente en esta ocasión a la yema, era proporcional al volumen de gemación. Así, calculamos la velocidad específica de crecimiento de la yema (S-G2) para ese tamaño celular, dividiendo su velocidad de crecimiento entre el volumen de gemación. Finalmente, se representó la velocidad específica de crecimiento (β/V_b) frente a dicho volumen (V_b) (**Figura 9D**). Y al igual que en G1, vimos que ésta también muestra una variabilidad similar a otros procesos biológicos, y por ello de nuevo usamos una representación mediante *bins* (**Figura 9E**).

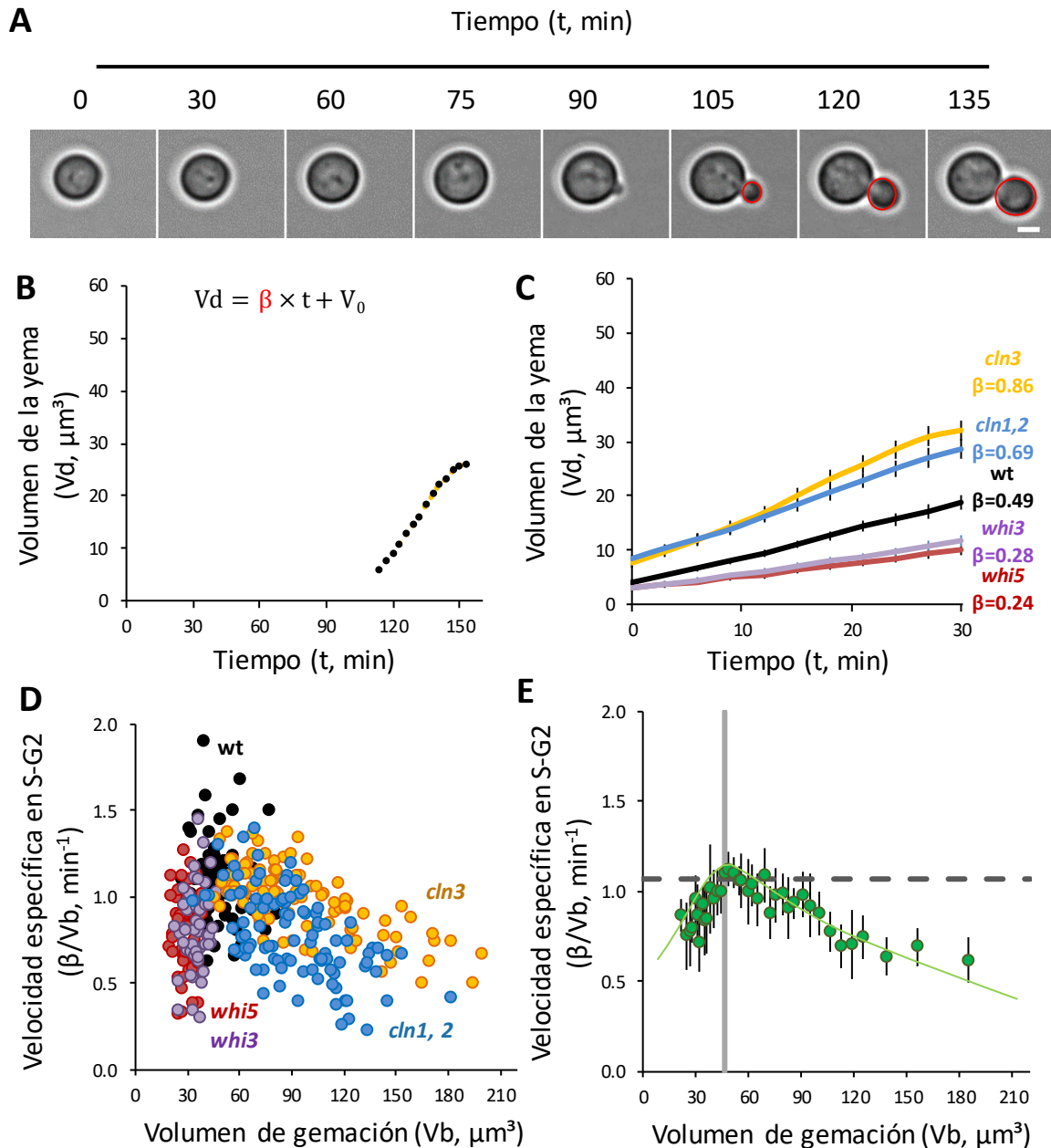


Figura 9: La velocidad específica de crecimiento en S-G2 decrece con el volumen.

(A) Imágenes mostrando el aumento del volumen celular de la yema (V_d) a lo largo del tiempo, para la misma célula de la **Figura 8A**. La barra indica una escala de $2\mu\text{m}$.

(B) Representación de la cinética de crecimiento en volumen para la yema de dicha célula. β es la velocidad de crecimiento de la yema en S-G2.

(C) Comparación entre las cinéticas de crecimiento en volumen para las células haploides y los mutantes de START *cln3*, *cln1,2*, *whi5* y *whi3*. Resultados promedio \pm límite de confianza (95%).

(D) Velocidad específica de crecimiento en S-G2 (β/V_b) con respecto al volumen de gemación (V_b) para las células de (C). Wt (negro, $n=75$), *whi5* y *whi3* (rojo y violeta, respectivamente, $n=50$), y *cln3* y *cln1,2* (amarillo y azul, respectivamente, $n=100$). Cada punto representa una célula distinta.

(E) Representación de todas las células en (D), agrupándolas en bins o intervalos de volumen cada 10 células. La línea gris y la línea de rayas grises indican el valor medio de V_b y de la velocidad específica, respectivamente, para las células wt de (D).

Las barras de error indican el intervalo de confianza ($\alpha=0.05$).

En la **Figura 9C** pudimos ver que las yemas de las células más grandes crecen más rápido que el wt, y las yemas de las células más pequeñas crecen más lento. Era de esperar, pero lo que nos interesaba era su relación con el volumen.

Como podemos observar, parece que existe una velocidad específica de crecimiento de la yema en S-G2 (β/V_b) máxima, determinada por un cierto rango de volúmenes de gemación, los correspondientes a las células wt una vez entrado en START. Y que, tanto para las células con volúmenes de gemación menores (*whi5* y *whi3*), de casi la mitad que el wt, como para las mayores (*cln3* y *cln1,2*), con hasta el doble de volumen del wt, esta velocidad específica de crecimiento en S-G2 disminuye con el volumen. Es interesante señalar que esta menor velocidad de crecimiento de la yema mostrada por los mutantes de START no fue debida a las mutaciones genéticas realizadas en ellos mediante la eliminación de tales genes, pues aquellos mutantes con volúmenes de gemación dentro del rango de volúmenes de las células wt (rango óptimo de volúmenes de gemación) mostraron también los mismos valores máximos de velocidad específica de crecimiento en S-G2 que el wt (**Figura 9D**). Por lo que los efectos observados en la velocidad para los mutantes no eran debidos a problemas genéticos, sino a sus volúmenes de gemación.

En resumen, durante el crecimiento isotrópico, las levaduras de gemación tienen en G1 una velocidad específica independiente de su tamaño celular, mientras que durante el crecimiento polarizado de las fases S-G2 su velocidad sí que presenta una dependencia con el volumen celular, el volumen de gemación.

Una vez visto esos resultados, nos preguntamos por las consecuencias que ello podría tener. El que la velocidad de crecimiento en G1 fuese proporcional al volumen, pero no en las fases S-G2, ¿implicaría posibles desventajas para aquellas células más grandes o pequeñas que el wt?

1.3. El volumen afecta al fitness en las levaduras de gemación

Anteriormente se pensaba que la velocidad de crecimiento del wt con respecto a los mutantes más pequeños, como el *whi5*, o más grandes, como el *cln3*, era prácticamente la misma, pues cuando mediamos sus tiempos medios de generación (calculados mediante el aumento de las OD₆₀₀ de cada cultivo a lo largo de 6-12h) no observábamos diferencias significativas. Pero tras los resultados obtenidos, no debido a la velocidad de crecimiento en G1, sino a la de S-G2, sí que deberíamos apreciar diferencias a tiempos suficientemente largos, pues ciclo tras ciclo se irían acumulando dichos efectos sobre el crecimiento y, por ello, sobre la proliferación celular.

Para responder a ello, nos propusimos realizar un experimento de “competición celular”, inoculando en un mismo cultivo a dos tipos de levaduras de gemación diferentes y observando qué población predominaría con el paso del tiempo. Así, llevamos a cabo tres cultivos o competiciones diferentes: wt vs wt o *whi5* o *cln3*. Para poder diferenciar cada tipo

de célula dentro de un mismo cultivo, insertamos en el wt el gen GFP (proteína verde fluorescente) bajo el promotor constitutivo TEF, mientras que en el otro wt, así como en *whi5* y en *cln3*, insertamos el gen de mCherry. Todas las células provenían de la misma cepa wt haploide CML128. Partiendo de cultivos en exponencial de cada una de las cepas por separado, se inocularon el correspondiente número de células de cada uno para empezar la competición con el 50% para cada tipo (**Figura 10A**). Todas las competiciones fueron llevadas a cabo por duplicado (mediante el uso de clones diferentes), incubadas a 30°C y a 180rpm. Cada 24 horas se tomaban muestras, se cuantificaba el número de células de cada tipo mediante microscopía de fluorescencia (**Figura 10B**), y finalmente se realizaban diluciones de cada cultivo hasta una OD₆₀₀ de 0.002, para que pudiesen seguir creciendo en un medio completo y rico en glucosa sin problemas.

En la **Figura 10C** se representaron los datos obtenidos para cada una de las competiciones mediante el porcentaje de células que expresaban mCherry, respecto al total de células del cultivo en ese momento, a lo largo del tiempo (número de generaciones) transcurrido desde el inicio de la competición.

Como podemos observar en la **Figura 10**, tanto las poblaciones de células grandes (*cln3*), como las de células pequeñas (*whi5*), van poco a poco disminuyendo con respecto al wt a lo largo del tiempo. Esto indica un menor tiempo de generación o división celular del wt, con lo que su población aumentaría más rápidamente que la de los mutantes dentro del mismo cultivo, predominando finalmente sobre los demás. Cabe pensar, fijándose en los anteriores resultados de las velocidades de crecimiento, que esas pequeñas diferencias en el tiempo de generación podrían ser consecuencia de los valores máximos de la velocidad específica de crecimiento en S-G2 observados para el wt.

Así, las levaduras de gemación habrían establecido un rango de volúmenes con los que una vez entrado en START, continuar creciendo en el ciclo celular a una velocidad óptima, lo cual les proporcionaría una clara ventaja evolutiva frente a otros volúmenes celulares.

Hemos visto las consecuencias negativas sobre el crecimiento de tener unos volúmenes cercanos a la mitad e incluso hasta el doble de los volúmenes vistos para las células wt de levadura de gemación. Fijándonos ahora solamente en las células más grandes que el wt, pues las células pequeñas podrían tener otros defectos por no haber conseguido el tamaño adecuado en la gemación al haber podido crecer demasiado rápido y tener ciertas carencias que afecten en su velocidad de crecimiento, ¿estos efectos continuarían aumentando a volúmenes mucho mayores? Primero tendríamos que asegurarnos de que, a tales volúmenes, las velocidades de crecimiento en G1 todavía sean las óptimas y si continúan siendo proporcionales a éstos.

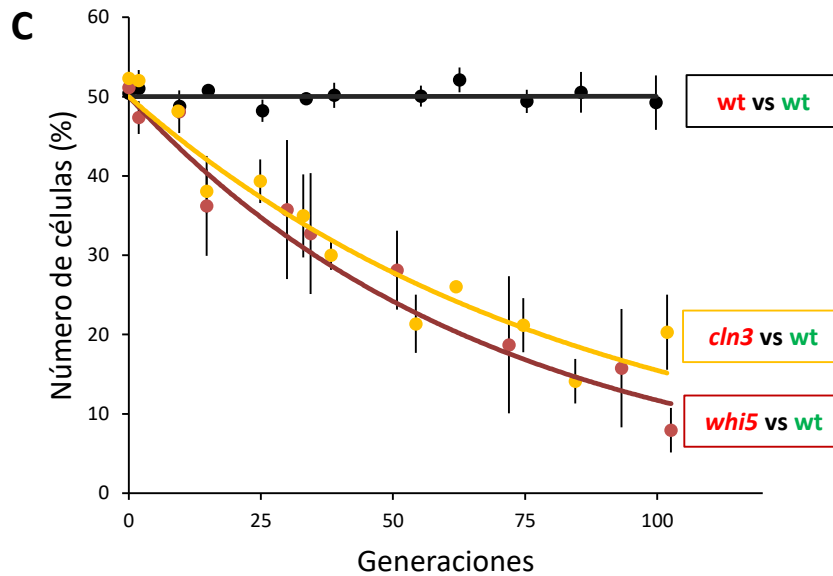
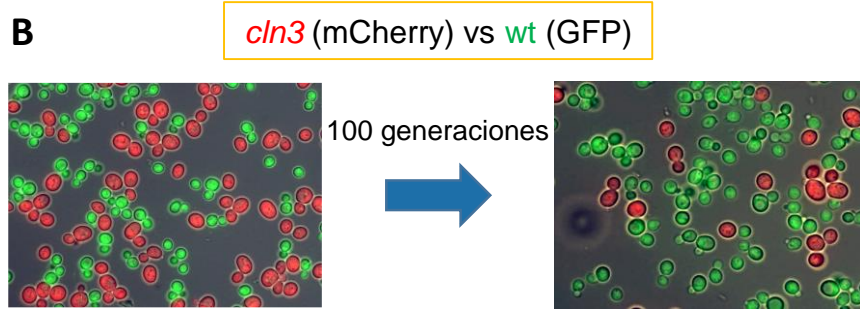
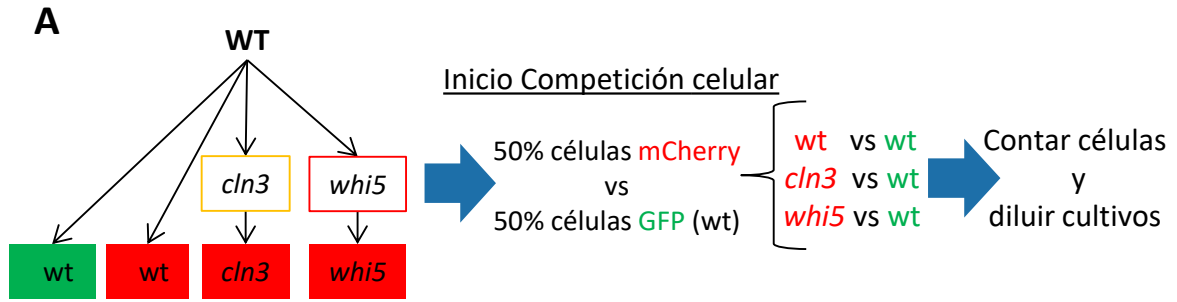


Figura 10: El volumen afecta al fitness en las levaduras de gemación.

(A) Esquema de los pasos llevados a cabo para la competición celular.

(B) Imágenes de una competición celular entre *wt* (células verdes) y *cln3* (células rojas), a tiempo inicial y tras 100 generaciones.

(C) Representación del porcentaje de células expresando mCherry para cada cultivo, frente al total de la población, a lo largo del tiempo (expresado en número de generaciones). *Wt* vs *wt* (puntos negros), o *cln3* (puntos amarillos), o *whi5* (puntos naranjas). Las barras verticales indican el error estándar.

1.4. La velocidad específica de crecimiento en G1 es independiente del tamaño incluso a volúmenes muy grandes

Para llevar a cabo el estudio de las velocidades específicas de crecimiento en G1 para células a volúmenes mucho mayores, seguimos usando exactamente la misma metodología que en la **Figura 8**. Pero en esta ocasión, para poder obtener volúmenes celulares mucho mayores, ya no pudimos hacer uso de los mismos mutantes de START, sino que, en esta ocasión usamos la cepa BF305 (*GALp-CLN3, cln1,2*). Ésta es un mutante de levadura de gemación haploide que carece de las ciclinas Cln1,2, y con la expresión de Cln3 bajo un promotor inducido por galactosa. Por lo que esta cepa sólo puede entrar en ciclo y proliferar en medios que contengan galactosa. Es decir, si ponemos a dichas células a crecer en glucosa, quedarán detenidas en G1 y crecerán en volumen, pero sin llegar a dividirse, pues no expresan ninguna ciclina de G1 y sin éstas las células son incapaces de fosforilar e inhibir al represor de G1 (*whi5*) y realizar la transición G1/S. Sólo hasta que las pongamos en un medio con galactosa y sin glucosa presente, entonces podrán entrar en el ciclo celular y dividirse. Así, poniendo a las células por diferentes tiempos en glucosa, podemos obtener una variedad de tamaños celulares mucho mayores que el wt.

Se empezó con un cultivo exponencial de BF305 en un medio rico y de galactosa. Se quiso estudiar las células hijas, de primer ciclo, pues éstas aún no han determinado su volumen de gemación al pasar START. Además, el objetivo era seguir el crecimiento de las células para un rango de volúmenes lo más amplio posible, por lo que cuanto más pequeñas fuesen las células, es decir, cuanto menos tiempo haya pasado desde su nacimiento mejor. Para ello, se utilizó un gradiente de densidad mediante Ficoll, para seleccionar las células más pequeñas y además asegurarnos de que fueran las de primer ciclo.

Una vez aisladas dichas células, las pasamos a un medio de glucosa para retenerlas en G1 y las monitorizamos durante 6 horas para seguir su crecimiento en volumen. Como anteriormente, a partir de los datos del aumento del volumen celular con el tiempo, hicimos una regresión lineal para obtener la velocidad (α). Como el período de crecimiento fue muy largo, lo dividimos en tramos de 60 minutos para sacar de cada uno de ellos la velocidad correspondiente, mediante una regresión lineal de 30 minutos. Al igual que en los experimentos anteriores, como arbitrariamente se mide la velocidad de crecimiento para un volumen dado, usamos para ello el volumen inicial de cada tramo. Como la velocidad depende de la masa, y cada célula podría tener un volumen diferente en el momento de medir su crecimiento, en la **Figura 11A** ordenamos las células por tamaños para representar su velocidad de crecimiento frente al volumen celular, mostrando cada rango de volúmenes en un color.

Como sucedía con el wt y los mutantes de START cuando medíamos su crecimiento en G1, para las células BF305 su velocidad específica de crecimiento sigue siendo independiente del volumen, sin importar en el rango de volúmenes a la que sea medida ésta. Así, las células continúan creciendo exponencialmente en G1 hasta volúmenes muy grandes, pues parece

que no existen problemas de crecimiento ni limitaciones en esta fase del ciclo, al menos hasta estos tamaños celulares.

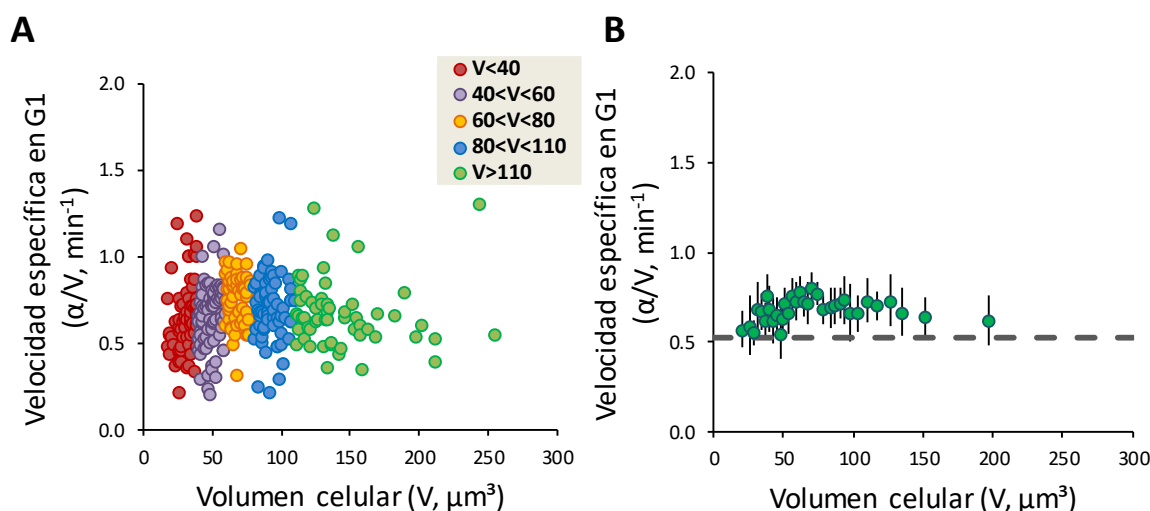


Figura 11: La velocidad específica de crecimiento en G1 es independiente del tamaño incluso a volúmenes muy grandes.

(A) Velocidad específica de crecimiento en G1 (α/V) frente al volumen celular para la cepa BF305 con $V < 40\text{fL}$ ($n=73$), $40 < V < 60\text{fL}$ ($n=86$), $60 < V < 80\text{fL}$ ($n=58$), $80 < V < 110\text{fL}$ ($n=68$) y $V > 110$ ($n=57$). Cada punto representa una célula distinta.

(B) Representación de todas las células en (A), agrupándolas en intervalos de volumen cada 10 células. La línea de rayas grises indica el valor medio de la velocidad específica de crecimiento en G1 para las células wt (**Figura 8C**). Las barras de error indican el intervalo de confianza ($\alpha=0.05$).

Anteriormente, vimos las consecuencias negativas sobre la velocidad de crecimiento por tener unos volúmenes cercanos a la mitad e incluso hasta el doble de los volúmenes correspondientes a las células wt de levadura de gemación durante las fases S-G2 (**Figura 9**), a pesar de no tener problemas de crecimiento en G1. Pero ¿estos efectos continuarían aumentando a volúmenes celulares mucho mayores?

1.5. La velocidad específica de crecimiento en S-G2 disminuye drásticamente a volúmenes muy grandes

Para estudiar la tendencia de las velocidades de crecimiento en las fases S-G2 a volúmenes muy grandes, utilizamos de nuevo la cepa BF305, las cuales son capaces de crecer exponencialmente en G1 hasta tamaños muy grandes.

De nuevo, lo primero que hicimos fue comenzar con un cultivo exponencial de la BF305 en galactosa, pues sin ésta no podrían expresar ninguna ciclina de G1 ni dividirse. De dicho cultivo, se fueron tomando alícuotas a diferentes tiempos y poniendo las células en glucosa.

De esa manera, paramos a las células en G1 (pues no tienen las ciclinas necesarias para entrar en START y pasar a las fases S-G2-M), con lo que a partir de ese momento siguieron creciendo, pero sólo en volumen, sin dividirse. Así, poniendo a las células por diferentes tiempos en glucosa, obtuvimos una gran variedad de tamaños mayores que el wt. Y justo antes de monitorizar las células para seguir su crecimiento en S-G2, y no en G1 como anteriormente, fueron puestas de nuevo en galactosa para inducir su entrada en el ciclo celular y que pudieran empezar a gemar tras pasar la transición G1/S. Las células siempre fueron incubadas a 30°C, tanto en su crecimiento en glucosa como en galactosa.

La manera de medir y calcular la velocidad específica de crecimiento en S-G2 (β/V_b) fue la misma utilizada para el caso del wt y los mutantes de START, mediante una regresión lineal de la cinética de crecimiento de la yema en los 30 minutos posteriores a la gemación, para obtener β , y dividiéndola entre V_b . Para analizar dichas velocidades, como ese experimento fue llevado a cabo en galactosa, las velocidades específicas de estas células fueron relativizadas con respecto a los valores medios de las células wt en S-G2 creciendo exponencialmente en glucosa (**Figura 9**), y con respecto a las células BF305 control que estuvieron creciendo en exponencial todo el tiempo (**Figura 12A**, BF305 exponencial), en un cultivo en galactosa, sin pararlas en G1 con glucosa en ningún momento. Así, se normalizaron las condiciones de crecimiento, pues en glucosa las células crecen más rápido que en galactosa (Leitao and Kellogg, 2017; Tyson et al., 1979).

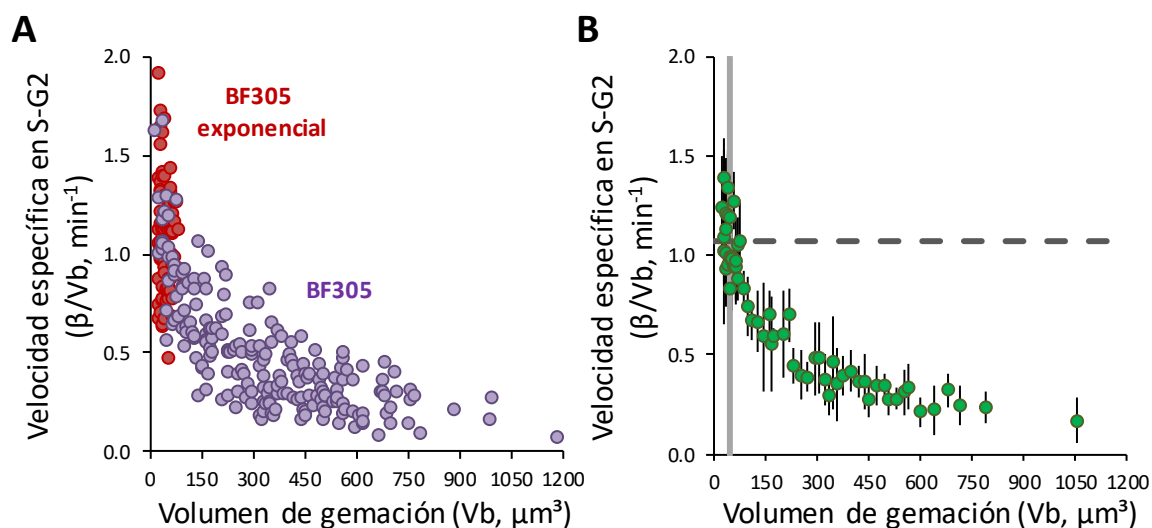


Figura 12: La velocidad específica de crecimiento en S-G2 disminuye drásticamente a volúmenes muy grandes.

(A) Velocidad específica de crecimiento en S-G2 (β/V_b) con respecto al volumen de gemación (V_b) para la BF305 exponencial (control, $n=98$) y la BF305 ($n=200$). Cada punto representa una célula distinta.

(B) Representación de todas las células en **(A)**, agrupándolas en *bins* o intervalos de volumen cada 5 células. La línea gris y la línea de rayas grises indican el valor medio de V_b y β/V_b , respectivamente, para las células wt de la **Figura 9D**. Las barras de error indican el intervalo de confianza ($\alpha=0.05$).

Según los datos mostrados para la BF305, observamos una fuerte disminución de la velocidad específica de crecimiento de la yema en S/G2 conforme aumenta el volumen de gemación, disminuyendo drásticamente para volúmenes muy grandes, en comparación con la velocidad máxima correspondiente a la BF305 creciendo exponencialmente, y cuyo rango de volúmenes de gemación fue prácticamente idéntico a los de las células wt de la **Figura 9**.

Esta disminución de la velocidad específica en S-G2 no fue debida a que las células BF305 ya tuvieran problemas de velocidad en G1 por ser tan grandes, pues como vimos, las células de levadura son capaces de crecer exponencialmente durante la fase G1 (crecimiento isotrópico) hasta tamaños muy grandes. Es más, en nuestro laboratorio se vio que las velocidades de crecimiento de las células en G1 no tenían una correlación con las velocidades en S-G2.

Cabe destacar que se usó la cepa BF305 como modelo para poder obtener unos volúmenes celulares muy grandes en las levaduras de gemación, pero que la disminución de la velocidad tampoco es debida a las mutaciones genéticas de estas células, las cuales no expresaban Cln1,2. A diferencia de los experimentos donde hicimos uso de células de levadura wt y de mutantes de START, es decir, con diferente fondo genético, en los experimentos donde usamos la BF305, solamente estudiábamos este tipo de células, por lo que no habían diferencias genéticas entre las muestras. Lo único que variaba era el volumen. Y al igual que lo visto anteriormente, para las células de BF305 que fueron paradas en G1, pero que cuando volvieron a gemar su volumen estaba dentro del rango de las células creciendo de manera exponencial en galactosa (las que nosotros llamamos BF305 exponencial o control), las velocidades mostradas fueron las mismas, las máximas. Por lo que la disminución en las velocidades específicas de crecimiento de la yema en S-G2 se debe exclusivamente al aumento en los volúmenes de gemación.

Así, pudimos concluir que el crecimiento polar de las levaduras de gemación (el de la yema en S-G2) está afectado por el tamaño celular, pues la velocidad específica de éstas (β/V_b) disminuye considerablemente con el aumento del volumen (V_b).

Por lo tanto, deben existir mecanismos activos que en función del volumen vayan regulando el crecimiento. Así, las células entran en START y determinan su volumen de gemación, el cual depende de la velocidad de crecimiento en G1 para cada célula, y podría haber mecanismos activos o factores limitantes que conectasen dicho volumen con la velocidad de crecimiento en S-G2. Nos preguntamos cómo sería la regulación de dichos factores, pues la dependencia de β con el V_b no seguía la teoría del crecimiento exponencial, de que cuanto mayor es una célula más rápido crece.

1.6. Las células con problemas en el crecimiento pierden la dependencia de la velocidad específica de crecimiento con el volumen

Podríamos pensar en la hipótesis de que existen factores que limitan la velocidad de crecimiento y hacen que ésta dependa del volumen para las fases S-G2. Si eso es cierto, nos preguntamos cuáles serían tales factores limitantes, y si las células con una velocidad de crecimiento ya reducida seguirían estando afectadas por dichos factores limitantes con respecto al volumen.

Para comprobarlo, buscamos un mutante que tuviera la velocidad de crecimiento afectada. Usamos la cepa *ydj1*, porque Ydj1 es una chaperona del grupo Hsp40 y un regulador muy importante del ciclo celular, y cuyo mutante es sabido que tiene problemas con la velocidad de crecimiento, y que ha perdido la dependencia del V_b con α (Ferrezuelo et al., 2012). Midiendo el aumento de su masa mediante las OD_{600} , vimos que su tiempo de generación era un poco más del doble que las células wt de levaduras de gemación (4h/ciclo frente a 1.7h/ciclo para el wt), por lo que éste era un buen modelo. Y ya que *ydj1* tenía un volumen de gemación superior a las células wt, podríamos ver si su velocidad β disminuía o no con el aumento de éste.

Para calcular su velocidad específica de crecimiento en S-G2 se procedió de manera similar a como se hizo anteriormente para el caso del wt y los mutantes de START. En esta ocasión, debido a que su velocidad de crecimiento era menor, se realizó una regresión lineal de 50 minutos para el cálculo de la pendiente (β). En la **Figura 13** se muestra la velocidad específica de crecimiento en S-G2 con respecto al volumen de gemación, para el wt y los mutantes *cln3* e *ydj1*. El primero (*cln3*) es un mutante que tiene un volumen de gemación del doble que el wt, pero no tiene problemas en su velocidad de crecimiento, a excepción de que en S-G2 exista algo que limita la velocidad con el volumen. En cambio, *ydj1* tiene igualmente el doble de V_b que el wt, pero es un mutante que tiene la velocidad de crecimiento afectada.

Como vimos en la **Figura 13**, *ydj1* no tenía el mismo comportamiento que las demás células. Para éste, se ha perdido toda dependencia entre la velocidad específica de crecimiento en S-G2 y el volumen de gemación, a la vez que su β/V_b se redujo prácticamente a la mitad con respecto al valor del wt.

Ya sabíamos que en *ydj1* la velocidad de crecimiento estaba afectada, pues crecía más lento, pero lo quisimos comprobar (datos no mostrados) y observamos que efectivamente en G1 su velocidad específica, aparte de no existir dependencia de ésta con el volumen al igual que pasaba con el resto de las células y mutantes de levadura, también se reducía, y prácticamente a la mitad comparada con la del resto de casos estudiados.

Así, el mutante *ydj1* tiene su velocidad de crecimiento afectada, con problemas que observamos en la reducción tanto de su velocidad en G1 como en S-G2. Y posiblemente sea ese el motivo por el cual los mecanismos o factores limitantes con el volumen de gemación en S-G2 dejan de serlo a la velocidad de crecimiento más lenta de dichos mutantes.

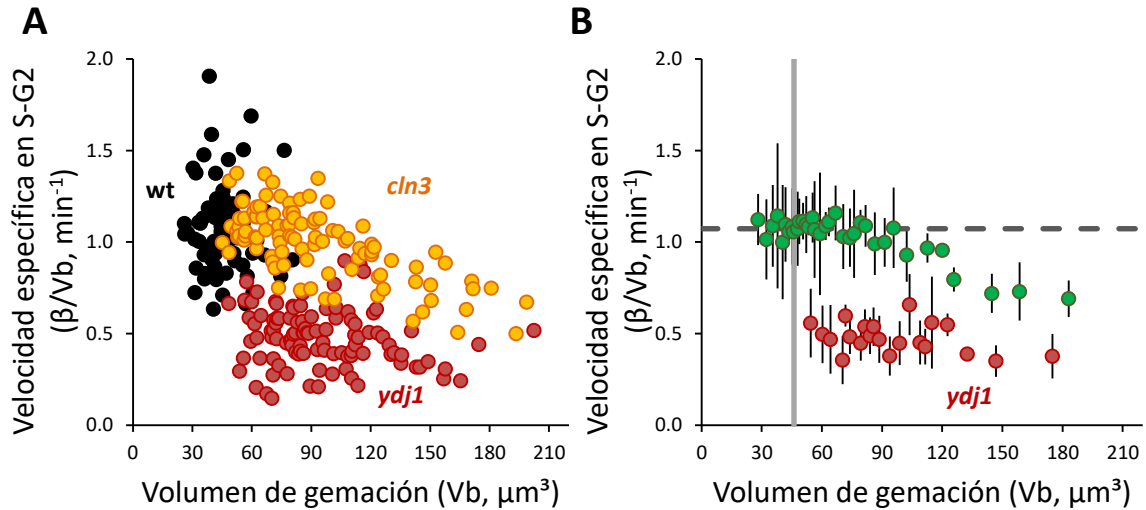


Figura 13: Las células con problemas en el crecimiento pierden la dependencia de la velocidad específica de crecimiento con el volumen.

(A) Velocidad específica de crecimiento en S-G2 (β/V_b) con respecto al volumen de gemación (V_b) para el wt (negras, $n=75$), *ydj1* (rojas, $n=104$) y *cln3* (amarillas, $n=100$). Cada punto representa una célula distinta.

(B) Representación de todas las células en (A), agrupándolas en *bins* o intervalos de volumen cada 5 células. Las células verdes representan las levaduras que no tenían la velocidad afectada (wt y *cln3*), y las células rojas las que sí (*ydj1*). La línea gris y la línea de rayas grises indican el valor medio de V_b y β/V_b , respectivamente, para las células wt. Las barras de error indican el intervalo de confianza ($\alpha=0.05$).

¿Estarían las chaperonas comprometidas al final de G1, siendo un factor limitante en el paso de la velocidad de G1 a S-G2? Si comparamos las velocidades específicas en G1 y en S-G2 entre *ydj1* y las demás células, vimos que en G1, la α/V de *ydj1* se reducía a la mitad con respecto a todas ellas. β/V_b también se redujo a la mitad si las comparamos con las células de su rango de volúmenes (*cln3*), pero comparadas con los valores máximos de wt esta velocidad en S-G2 todavía se reducía algo más. Para el wt, la β/V_b aumenta prácticamente el doble con respecto a α/V (2.04 veces exactamente), mientras que para las células *cln3* este aumento es menor que el doble (1.72 veces), pues como tienen volúmenes mayores, en S-G2 su velocidad disminuía. En el caso de *ydj1*, el cual tiene tamaños grandes similares a *cln3*, sucede algo parecido y dicho aumento también es algo menor del doble (1.88 veces). Es decir, *ydj1* siempre crece más lento, pero todavía es capaz de aumentar la velocidad de crecimiento post-gemación. Por lo tanto, parece improbable que las chaperonas fuesen los factores más importantes que limitan la velocidad específica en función del volumen de gemación.

El volumen de gemación depende de la velocidad de crecimiento en G1. α y β no están correlacionadas. La velocidad específica en S-G2 depende del volumen de gemación y a volúmenes grandes dicha velocidad decrece en los mutantes que no tienen tocada la velocidad. Ello podría ser debido a que la célula tiene mecanismos activos que en función del tamaño celular va frenando la velocidad de crecimiento, por motivos que desconocemos.

Pero en células que sí tienen afectado el crecimiento, además de crecer más lento, podría ser que al haber perdido la correlación entre el volumen y la velocidad en G1, en G2 tampoco exista una relación de la velocidad con el Vb, y por ello no decrece más la velocidad específica cuando aumenta el volumen. Con lo que el responsable de esos mecanismos activos limitantes con el volumen debe estar en un nivel de regulación posterior al control de la velocidad de crecimiento en sí. Pues si hay problemas en dicho control, la velocidad ya no estará afectada por esos factores que la limitaban y la hacen dependiente del volumen.

Tras las anteriores observaciones en nuestro modelo de levadura de gemación, nos preguntamos por las causas de dicha disminución en la velocidad específica de crecimiento en S-G2 con el volumen, y por la naturaleza de los factores limitantes. Ello podría ser debido tanto por el volumen en sí, es decir, a una regulación directa de la velocidad con el volumen, como por ciertas limitaciones en la expresión génica que hicieran a la velocidad dependiente del volumen. Cabría esperar que tal limitación estuviera relacionada con genes involucrados en el crecimiento celular polarizado, es decir, a partir del momento de la gemación y en las fases S-G2, que es donde se encontraron las disminuciones de la velocidad de crecimiento, pues durante el crecimiento isotrópico (fase G1) sí que se observó un aumento en la velocidad de crecimiento acorde con el aumento en el volumen o masa celular.

La siguiente pregunta que nos hicimos fue si siempre que las células de levadura de gemación tuvieran un volumen mayor que el wt, iban a tener una velocidad específica menor. Para poder comprobarlo, pensamos en estudiar dicha dependencia alterando la ploidía, porque sabemos que las células diploides wt duplican el tamaño correspondiente a las haploides.

1.7. La velocidad específica de crecimiento en S-G2 para el wt no decrece con el volumen de gemación, si va acompañado de un aumento de la cantidad de DNA

Como dijimos anteriormente, el hecho de que pensemos que los factores limitantes de la velocidad con el volumen pudiesen estar relacionados con una insuficiencia génica era debido a que a partir de la gemación podría ser que la expresión de algunas proteínas no escalase con el volumen, y por ello, si las células aumentaban demasiado en volumen pero la expresión de esos genes no lo hacían proporcionalmente a éste, en el caso de que estuvieran relacionados con el crecimiento polar, se apreciarían disminuciones como las observadas en la velocidad de crecimiento en S-G2.

Nos preguntamos si esto se podría resolver estudiando la ploidía, mediante el uso de células que, con respecto al haploide que veníamos utilizando hasta ahora como modelo, tuvieran el doble de todo, de DNA y de volumen. En primer lugar, quisimos comparar las células haploides tanto con las células diploides como con las tetraploides. Con ello, veríamos

qué sucede en el caso de células diploides que tienen prácticamente el doble de volumen, el doble de masa, pero con el doble de material genético. Y con las células tetraploides lo mismo, pero 4 veces más de volumen y DNA que las haploides. A través del tiempo de generación, medido con el aumento de la masa o las OD₆₀₀, otras investigaciones vieron que no existían diferencias significativas en la velocidad específica de crecimiento correspondientes a las diferencias en la ploidía (Galitski et al., 1999; Takagi et al., 1983). Por lo que cabría esperar que no existiese ninguna limitación de la velocidad específica de crecimiento en volumen por la ploidía, en términos del número de copias de cada gen y su expresión.

Nosotros decidimos comprobarlo estudiando sus velocidades específicas en S-G2 frente al volumen. El cálculo de β/V_b se hizo como anteriormente, a partir de la pendiente de la regresión lineal de la cinética del volumen de la yema (**Figura 14A**), y dividida por el volumen de gemación. Para estar seguros de los datos obtenidos y de que fueran independientes del fondo usado, llevamos a cabo dos experimentos de la medida de la velocidad en S-G2 de la yema para las células haploides, diploides y tetraploides (Sorenson et al., 2015; Xie et al., 2018), siendo cepas isogénicas para cada uno de los casos, pero en dos fondos genéticos diferentes (**Figura 14B y D**).

Según los resultados mostrados, la velocidad de crecimiento absoluta de la yema en S-G2 (β) del tetraploide es prácticamente el doble que para el diploide, y a su vez la de éste el doble que para el haploide. Pero para ver si cumplían la teoría del crecimiento exponencial, que cuanto más grande es más rápido crece, es decir, si crecían de una manera proporcional al volumen, tuvimos que operar como en anteriores ocasiones y estudiar sus velocidades específicas. Y debido a que los volúmenes del tetraploide son casi el doble que el diploide, y los tamaños de éstos el doble que los del haploide, pudimos comprobar que, a pesar de sus diferencias en los volúmenes de gemación, la velocidad específica de crecimiento en S-G2 para todos ellos fue prácticamente la misma, independientemente de la ploidía, y sin variar con el volumen de gemación (al menos para ese rango de volúmenes correspondiente a las células wt). Los resultados obtenidos para ambos experimentos fueron prácticamente los mismos, por lo que ello se cumplía independientemente del fondo usado.

Con ello, hemos visto qué sucede en el caso de células que tienen prácticamente el doble de volumen, el doble de masa, pero con el doble de material genético (para el caso de los diploides y los haploides). Este resultado era de esperar, pues todas las células usadas fueron wt e isogénicas, y como ya mencionamos anteriormente, ya era conocido que no había diferencias entre sus velocidades específicas generales, pero nosotros lo queríamos comprobar para el caso del crecimiento polar de la yema en S-G2 en particular, pues es donde sí que vimos problemas para las células haploides con volúmenes tan grande como el tetraploide.

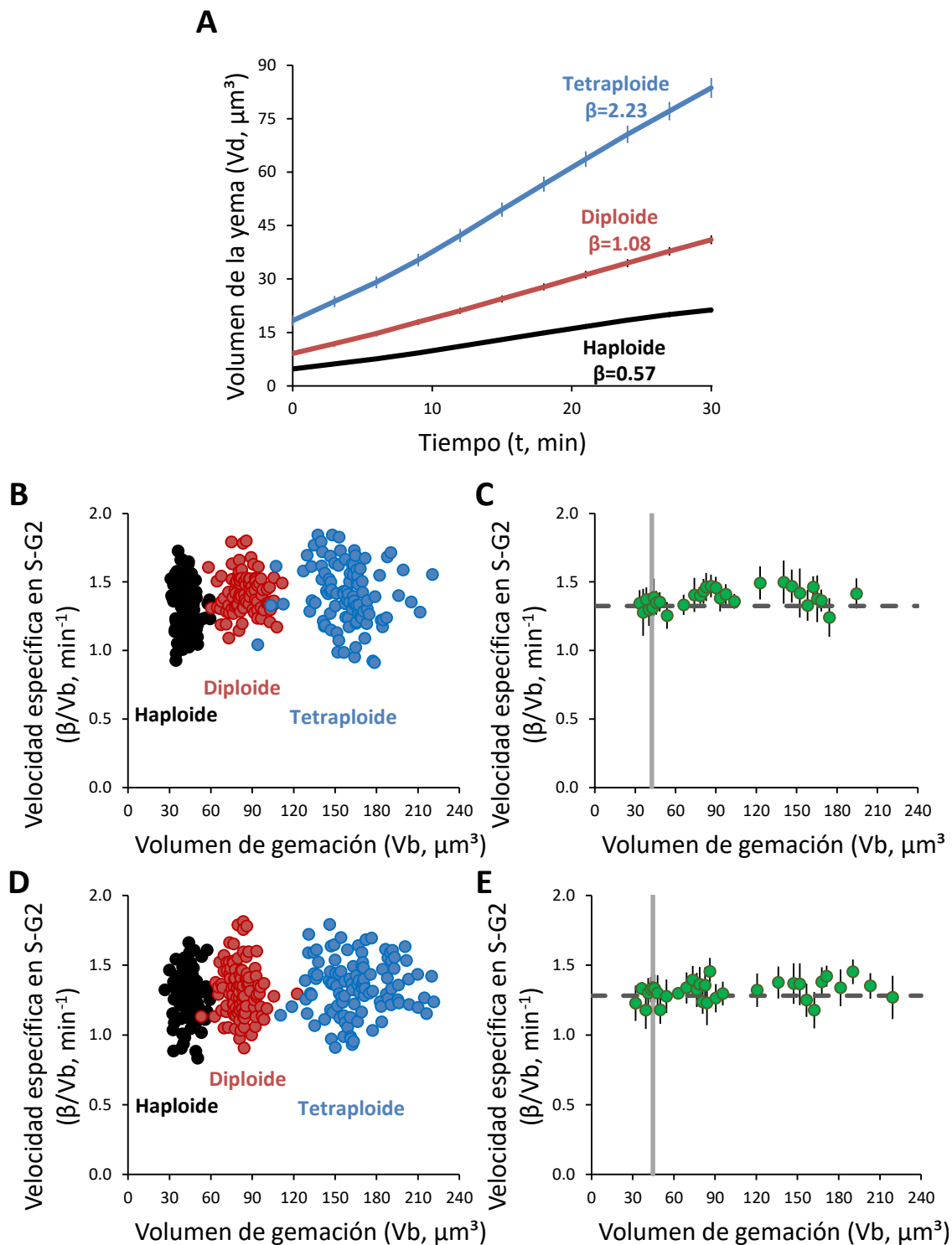


Figura 14: La velocidad específica de crecimiento en S-G2 para el wt no decrece con el volumen de gemación, si va acompañado de un aumento de la cantidad de DNA.

(A) Comparación entre las cinéticas de crecimiento en volumen para las células haploides, diploides y tetraploides representadas en (D). β es la velocidad de crecimiento de la yema en S-G2.

(B) Velocidad específica de crecimiento en S-G2 (β/V_b) con respecto al volumen de gemación (V_b) para el haploide (negro, $n=105$), diploide (rojo, $n=108$) y tetraploide (azul, $n=110$). Cada punto representa una célula distinta. (D) Mismo experimento que en (B) pero con otro fondo, el de las células en (A). Haploide (negro, $n=90$), diploide (rojo, $n=100$) y tetraploide (azul, $n=102$).

(C) Representación de todas las células en (B), agrupándolas en *bins* o intervalos de volumen cada 10 células. La línea gris y la línea de rayas grises indican el valor medio de V_b y de la velocidad específica, respectivamente, para las células haploides. (E) Misma representación que en (C) pero de todas las células en (D).

Las barras de error indican el intervalo de confianza ($\alpha=0.05$).

Los datos obtenidos hasta ahora nos sugerían que podría existir algún mecanismo activo por el cual el tamaño celular limitase la velocidad de crecimiento de la yema. Dicho mecanismo debería de estar *downstream* del control o regulación del crecimiento celular, pues en células con la velocidad de crecimiento afectada (**Figura 13**), éste no decrecía más con el volumen. Pero ahora estábamos estudiando cuales podrían ser aquellos factores limitantes, manteniendo la concentración de DNA, porque una de las cosas que disminuía en las células haploides con volúmenes muy grandes era su concentración de DNA al aumentar el volumen.

Los resultados con células diploides y tetraploides indican que los problemas de crecimiento en las fases S-G2 no eran debidos al tamaño en sí. Pero para saber si realmente existían unos factores limitantes y si eran debidos a una insuficiencia génica, pensamos en comparar células con un tamaño similar a los diploides y los tetraploides, pero con menor número de copias de DNA.

1.8. La velocidad específica de crecimiento en S-G2 está afectada por la relación volumen/DNA

Para poder estudiar células con volúmenes similares, pero diferente cantidad de DNA, de nuevo hicimos uso de nuestra cepa modelo BF305. En comparación con las células diploides y tetraploides, las células BF305 eran haploides, por lo que, a pesar de poder alcanzar el mismo tamaño celular, tendrían una carencia en el número de copias génicas con respecto a aquellas.

Así, llevamos a cabo los mismos estudios mostrados hasta ahora, para comparar sus velocidades específicas de crecimiento en S-G2 frente al volumen, con exactamente el mismo procedimiento para el cálculo de β/V_b (**Figura 15A**). Las cepas isogénicas haploides, diploides y tetraploides usadas fueron las de la **Figura 14D**, y para las células haploides con volúmenes superiores al wt se usaron la cepa BF305 de la **Figura 12**, la cual usamos para poder obtener volúmenes similares al tetraploide, pues con los mutantes de START se alcanzaban volúmenes de hasta el doble del wt, es decir, volúmenes comparables con las células diploides.

Todas estas células fueron cultivadas en glucosa, pero para ver como crecían las células BF305 en las fases S-G2 era necesario el uso de galactosa, por lo que quisimos usar también un mutante de START para obtener volúmenes similares al diploide, pero que hubiese estado creciendo en glucosa. Y también para poder estudiar los mismos efectos en células con diferente fondo. Así, hicimos también uso de los mutantes *cln1,2* de la **Figura 9**, pues eran las células más parecidas genéticamente a la BF305, al tener las mismas deleciones de las ciclinas Cln1,2 que ésta. Debido a que para las células de *cln1,2* fueron datos obtenidos en días diferentes, y en el caso de la BF305 con el uso de una fuente de energía también diferente, relativizamos sus valores de β/V_b con respecto al wt haploide usado en la **Figura 14D**. En la **Figura 15B** hicimos uso de los *bins* para una visualización más clara mediante agrupaciones de células por intervalos de volúmenes. Por un lado, agrupamos a las células isogénicas

haploides, diploides, y tetraploides, y por el otro agrupamos a las células haploides *cln1,2* y a la BF305.

Así, en la **Figura 15** pudimos comparar entre las diferentes células, cubriendo el mismo rango de volúmenes de gemación, aunque teniendo como diferencia la ploidía. Para los mutantes haploides BF305 y *cln1,2* obtuvimos prácticamente los mismos resultados, a pesar de ser fondos genéticos diferentes. Poniendo de nuevo de relieve que lo que limitaba sus velocidades de crecimiento eran los posibles factores relacionados con el volumen, y no causas genéticas.

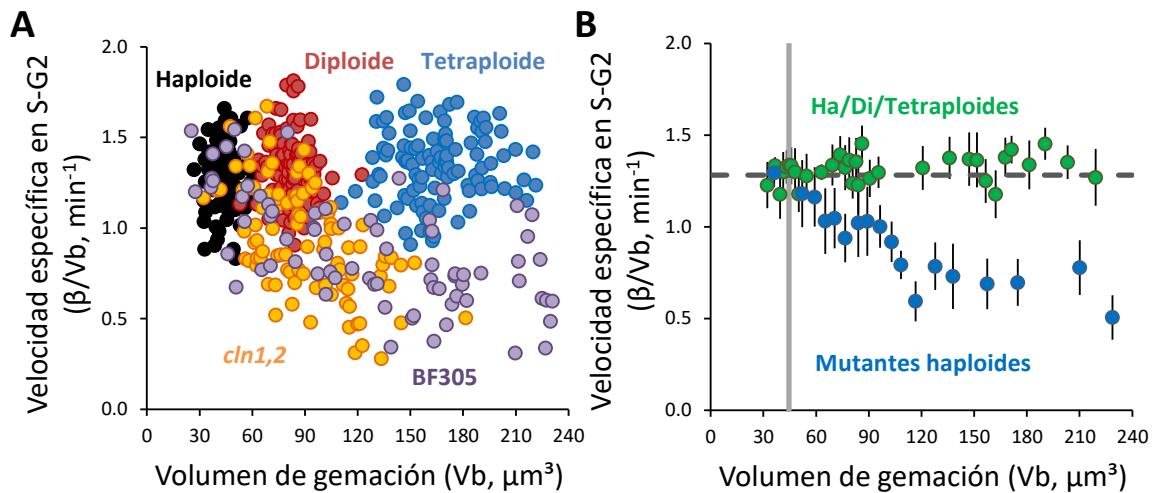


Figura 15: La velocidad específica de crecimiento en S-G2 está afectada por la relación volumen/DNA.

(A) Velocidad específica de crecimiento en S-G2 (β/V_b) con respecto al volumen de gemación (V_b) para el haploide (negro, $n=105$), diploide (rojo, $n=108$) y tetraploide (azul, $n=110$) de la **Figura 14D**, y para las células haploides BF305 (violeta, $n=74$, **Figura 12**) y *cln1,2* (amarillo, $n=100$, **Figura 9**). Cada punto representa una célula distinta.

(B) Representación de todas las células en **(A)**, agrupándolas en *bins* o intervalos de volumen cada 10 células. Haploides, diploides y tetraploides (verdes) y *cln1,2* y BF305 (azules). La línea gris y la línea de rayas grises indican el valor medio de V_b y de la velocidad específica, respectivamente, para las células haploides. Las barras de error indican el intervalo de confianza ($\alpha=0.05$).

Podemos observar que, así como para las células haploides con volúmenes de gemación superiores a las células haploides wt existía una limitación en el crecimiento polarizado de las fases S-G2 con respecto al volumen, no vimos tal limitación en el caso de las células diploides y tetraploides, pues aun teniendo volúmenes comparables, tenían el doble o cuatro veces más de DNA, respectivamente, que las células haploides. Con lo que la velocidad específica estaría afectada por la relación V_b /DNA.

Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que posiblemente los factores limitantes de la velocidad de crecimiento en S-G2 con respecto al volumen son debidos a una insuficiencia génica. Es decir, la expresión de algunos genes podría no aumentar

proporcionalmente con el tamaño celular, teniendo serias afectaciones en la velocidad en aquellas células con volúmenes de gemación superiores a las células wt.

Tras las anteriores observaciones (en nuestro modelo de levadura de gemación), nos preguntamos por las causas o los factores de la disminución en la velocidad de crecimiento con el volumen celular, y en qué genes existiría una limitación en su expresión. Tal limitación debería estar relacionada con el crecimiento polarizado, es decir, a partir del momento de la gemación (transición G1/S y fases S-G2). Pues durante el crecimiento isotrópico (fase G1), se observó un aumento en la velocidad de crecimiento acorde con el aumento en el volumen o masa celular. Como es sabido, para el crecimiento de la yema en las levaduras de gemación es necesario un transporte de todos los materiales y componentes celulares (carga) desde la célula madre hacia la yema naciente a través del cuello que las separa. Ello se realiza mediante las vesículas de secreción, las cuales son transportadas a través de los cables de actina por la proteína Myo2 (Bretscher, 2003).

2. Transporte de vesículas

2.1. La velocidad específica de transporte de Myo2 a la yema disminuye a volúmenes grandes

Como se mencionó anteriormente, en la búsqueda de los factores limitantes de la velocidad con el volumen, quisimos observar los mecanismos de transporte del cargo mediante vesículas durante el crecimiento polarizado, desde la célula madre hacia la yema. En primer lugar, seleccionamos para su estudio a Myo2, el cual es el encargado de transportar a las vesículas que contienen al cargo a través de los cables de actina (Pruyne et al., 2004). Si los factores limitantes formaran parte de la maquinaria de transporte de vesículas durante el crecimiento polarizado, veríamos posiblemente una afectación en esa velocidad de transporte en las células grandes. Para estudiar velocidades de transporte celulares se puede utilizar la técnica de FRAP (recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo), por lo que hicimos uso de ésta mediante un microscopio confocal (Donovan and Bretscher, 2015; Schott et al., 2002; Tagawa et al., 2005).

Para medir la velocidad de transporte (específica) de la proteína Myo2 desde la célula madre hasta la yema, tanto para el wt como para los diferentes mutantes con volúmenes de gemación menores (*whi5*) y mayores (*cln3* y BF305) que éste, fusionamos en esas cepas de levadura la proteína fluorescente GFP a Myo2. Pusimos los cultivos a crecer exponencialmente en glucosa, y para el caso de la BF305 se operó como lo mencionado anteriormente, es decir, después de tenerlas creciendo en exponencial en galactosa, las pasamos a glucosa por diferentes periodos de tiempo, para obtener un rango variado de tamaños celulares, y finalmente las pusimos de nuevo en galactosa para que empezasen a gemar de nuevo.

A continuación, con las células asíncronas, las plantamos en cámaras de incubación y se llevó a cabo la técnica de FRAP en un microscopio confocal, donde mediante el uso del láser realizamos un fotoblanqueo en toda la yema (**Figura 16A**) a tiempo=0, para eliminar toda emisión de fluorescencia en ésta. Seguidamente, tomamos imágenes cada 2 segundos durante unos minutos para medir la recuperación de dicha fluorescencia en la yema, gracias al transporte desde la célula madre. Con la representación de la cinética de recuperación de la fluorescencia (f) frente al tiempo (t) (**Figura 16B**), y su posterior normalización, ajustamos los datos de dicha gráfica a una ecuación logarítmica, " $f=m*\ln(t)+b$ ", y a través de una regresión lineal obtuvimos la velocidad de transporte (la pendiente, m).

Para calcular la velocidad específica de transporte de Myo2, la pendiente "m" se multiplica por el volumen de la yema (para obtener la fluorescencia total de ésta) y se divide por el volumen de gemación (para hacerlo específico o relativo al volumen). Cada valor lo relativizamos con respecto a la media de su control. En la **Figura 16C y D** se representa la velocidad específica de transporte de Myo2 relativa frente al V_b para todas las células estudiadas juntas, es decir, para las células wt, *whi5*, *cln3* y BF305. En la **Figura 16E** mostramos

la velocidad específica de transporte de las células wt en comparación con células que tenían afectada su velocidad de crecimiento, como en la **Figura 13**.

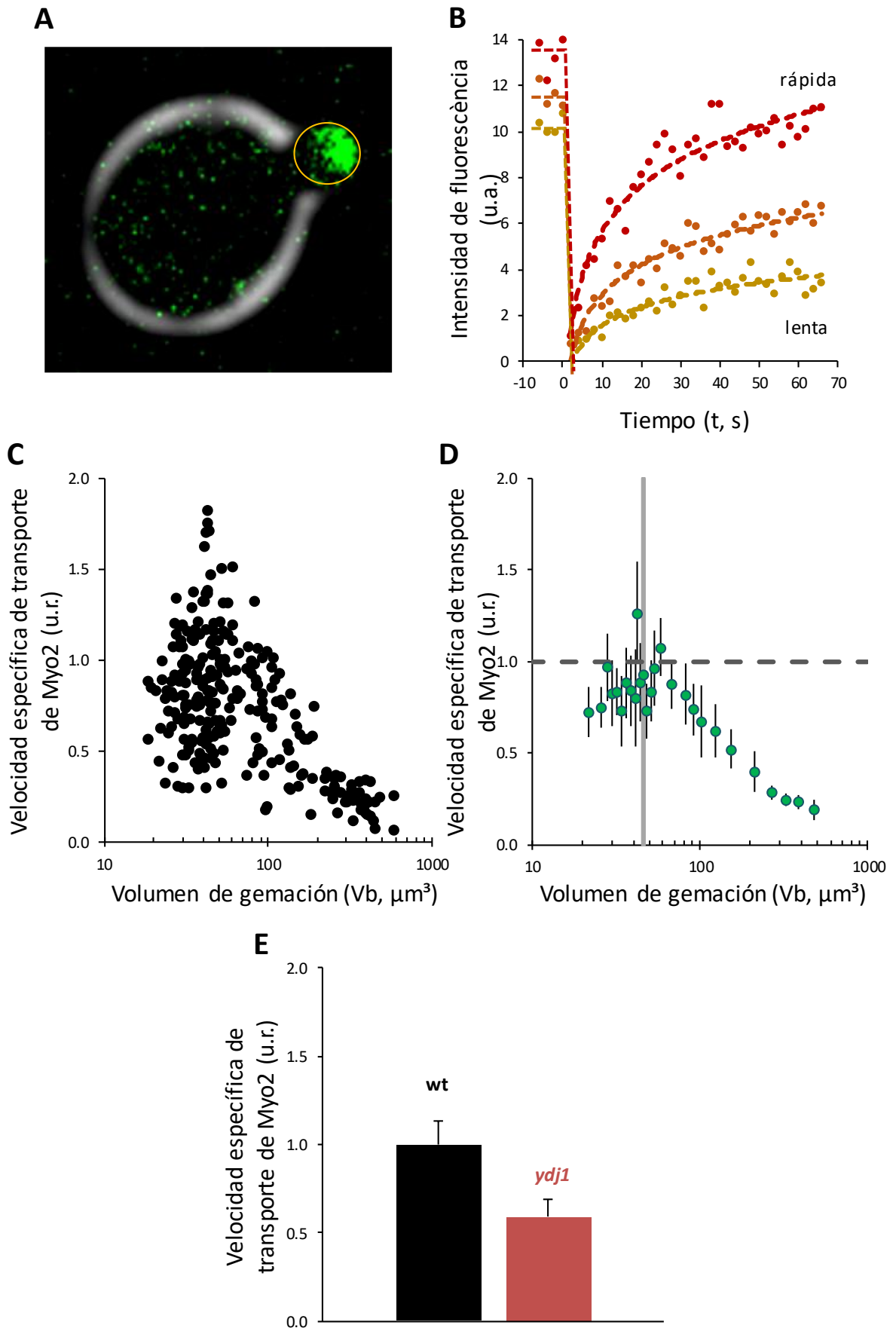


Figura 16: La velocidad específica de transporte de Myo2 a la yema disminuye a volúmenes grandes.

(A) Célula de levadura en gemación expresando Myo2-GFP en S-G2. El círculo amarillo indica el área del fotoblanqueo.

(B) Representación de las diferentes cinéticas de recuperación de fluorescencia (transporte) tras el fotoblanqueo, mediante el uso de la técnica de FRAP. Se muestran varias células wt con diferentes velocidades de transporte.

(C) Velocidad específica de transporte de Myo2 en S-G2 (en unidades relativas, u.r.), desde la célula madre hasta la yema, con respecto al volumen de gemación (V_b) de todas las células usadas en este estudio ($n=269$). Wt ($n=86$), *whi5* ($n=63$), *cln3* ($n=37$) y BF305 ($n=83$). Cada punto representa una célula distinta. Todos los valores fueron relativizados con respecto al wt o las células control.

(D) Representación de todas las células en (C), agrupándolas en *bins* o intervalos de volumen cada 10 células. La línea gris y la línea de rayas grises indican el valor medio de V_b y la velocidad específica de transporte de Myo2, respectivamente, para las células wt.

(E) Valores medios de la velocidad específica de transporte de Myo2 en S-G2 (en unidades relativas, u.r.), desde la célula madre hasta la yema, para las células wt ($n=14$) e *ydj1* ($n=15$). T-test (p -value) $<10^{-4}$.

Las barras de error indican el intervalo de confianza ($\alpha=0.05$).

Según podemos observar en la **Figura 16**, la velocidad específica de transporte para Myo2 disminuye tanto en las células más pequeñas como en las más grandes que el wt, disminuyendo significativamente a volúmenes muy grandes. Así, el transporte de Myo2 durante el crecimiento polarizado, desde la célula madre hacia la yema, está afectado por el tamaño, pues como hemos visto depende del volumen de gemación. Por lo que Myo2 podría ser uno de los factores limitantes de la velocidad de crecimiento y de su dependencia con el volumen.

Con la **Figura 16E**, pudimos validar que en células con un crecimiento afectado (*ydj1*), además de tener afectada la velocidad de crecimiento tanto en G1 como en S-G2, también lo está la velocidad de transporte de Myo2, así como posiblemente multitud de procesos relacionados con el crecimiento. La velocidad específica de transporte de Myo2 en el mutante *ydj1* disminuyó casi a la mitad con respecto al wt, cuyas células no tienen un crecimiento afectado.

Por tanto, en la búsqueda de factores que estuvieran limitando la velocidad de crecimiento de la yema, entre otras causas debido a una insuficiencia en su expresión a volúmenes celulares grandes, pensamos que podrían estar relacionados los mecanismos necesarios para el crecimiento polar, tales como el transporte de vesículas hacia la yema. Y efectivamente, vimos que en éste había problemas a tamaños grandes, y no se producía el transporte a la velocidad que debería. De momento solamente habíamos visto que el transporte estaba limitado a volúmenes grandes mediante el estudio del transportador de vesículas de secreción, Myo2. Pero no podemos asegurar ni que sea éste el único factor limitante responsable de la disminución de la velocidad de transporte a tamaños celulares grandes, ni que realmente sea Myo2 uno de esos factores. Sean cual sean los factores limitantes involucrados que forman parte de los mecanismos de transporte, seguramente afectarán a éste y a la velocidad de transporte de cualquiera de sus componentes.

Además de estudiar al transportador de las vesículas, quisimos estudiar también a las propias vesículas, a través de los componentes de la cubierta proteica que recubren a éstas.

2.2. La velocidad específica de transporte de Sec31 a la yema disminuye a volúmenes grandes

Para estudiar el transporte de las vesículas de secreción, necesarias para el crecimiento polar de la yema, durante las fases S-G2, y ver si dicho mecanismo dependía del volumen de gemación, al igual que para el caso de Myo2, decidimos observar alguno de los componentes de la cubierta proteica que recubren a estas vesículas.

Así, seleccionamos para su estudio a Sec31, la cual es un componente esencial del complejo de proteínas de cubierta vesicular COPII (Bickford et al., 2004). Dicha cubierta es requerida para la formación de vesículas de secreción en el transporte desde el retículo endoplasmático (RE) hacia el Golgi (Haucke, 2003). Según nuestras observaciones previas, así como también lo visto en otros estudios en los que detectaron a Sec31 en la yema, esta proteína también es transportada desde la célula madre hasta la yema, ya sea formando parte del recubrimiento de las vesículas de secreción o como parte del RE (Du et al., 2004).

Al igual que con el caso de Myo2, para estudiar velocidades de transporte de vesículas a través de Sec31, usamos la técnica de FRAP. De nuevo, hicimos uso de las células de levadura wt, de células más pequeñas (*whi5*) y de células más grandes (*cln3* y BF305), fusionando en todas ellas la proteína GFP a Sec31. Y procedimos exactamente de la misma manera que en la **Figura 16**. Tras un cultivo en exponencial, llevamos las células a un microscopio confocal, mediante el uso de un láser quemamos la yema de las levaduras en S-G2 (fotoblanqueo, $t=0$), y medimos la recuperación de la fluorescencia en la yema tomando imágenes cada 2 segundos. Con dicha cinética, tras su normalización, y ajustando los datos a la misma ecuación logarítmica ($f=m*\ln(t)+b$), obtuvimos la pendiente (m) o velocidad de transporte de Sec31 a través de una regresión lineal de los datos. Y de nuevo, multiplicamos dicha velocidad por V_d y la dividimos por V_b , para obtener la velocidad específica de transporte de Sec31. Cada valor lo relativizamos con respecto a la media de su control. En la **Figura 17A y B** se representó la velocidad específica de transporte de Sec31 relativa frente al V_b para todas las células.

En la **Figura 17** podemos observar que al igual que pasaba con Myo2, la velocidad específica de transporte de Sec31 disminuye tanto en las células más pequeñas como en las más grandes que el wt, cayendo drásticamente a volúmenes muchos más grandes que éste. Así pues, existe una dependencia del transporte de Sec31 con el volumen de gemación durante el crecimiento polarizado en S-G2.

Cabe señalar que, si pudimos medir la recuperación de la fluorescencia de Sec31-GFP en la yema, era debido al envío de dichas proteínas desde la célula madre a la yema. Como se comentó anteriormente, lo que estamos observando con el estudio de Sec31 seguramente

sea el transporte de parte del RE que la célula madre envía a la yema, y que éste se lleva a cabo por otra vía de transporte, no por vesículas (Fagarasanu and Rachubinski, 2007; Knoblach and Rachubinski, 2015). Es interesante ver como el transporte desde la madre hasta la yema, no solo de vesículas sino también de orgánulos como el RE, está limitado a volúmenes celulares grandes.

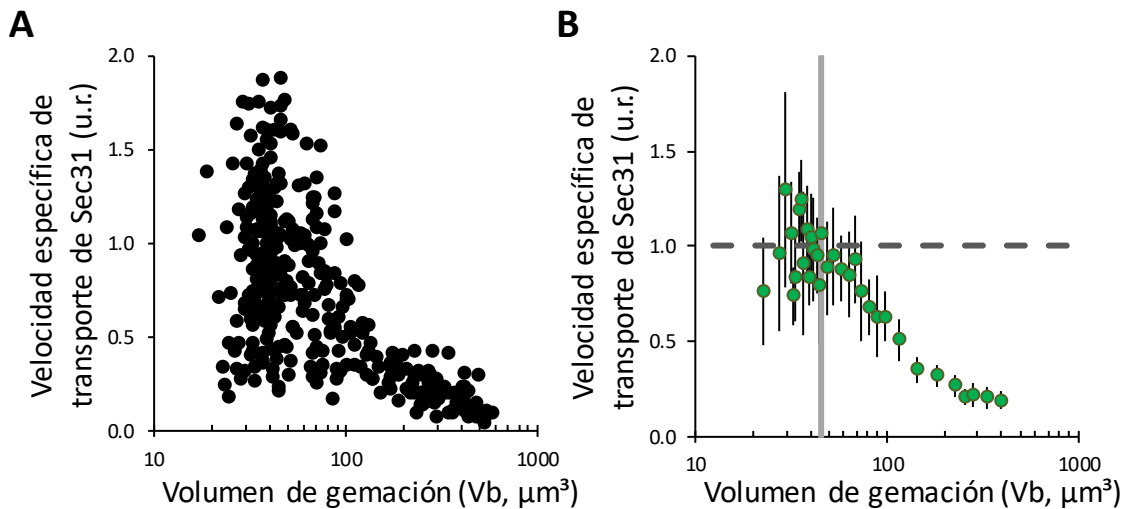


Figura 17: La velocidad específica de transporte de Sec31 a la yema disminuye a volúmenes grandes.

Las medidas de la velocidad específica de transporte de Sec31 fueron realizadas mediante la técnica de FRAP, de la misma manera que lo descrito en la **Figura 16**.

(A) Velocidad específica de transporte de Sec31 en S-G2 (en unidades relativas, u.r.), desde la célula madre hasta la yema, con respecto al volumen de gemación (V_b) de todas las células usadas en este estudio ($n=341$). Wt ($n=143$), *whi5* ($n=37$), *cln3* ($n=73$) y BF305 ($n=88$). Cada punto representa una célula distinta. Todos los valores fueron relativizados con respecto al wt o las células control.

(B) Representación de todas las células en **(A)**, agrupándolas en *bins* o intervalos de volumen cada 10 células. La línea gris y la línea de rayas grises indican el valor medio de V_b y la velocidad específica de transporte de Sec31, respectivamente, para las células wt. Las barras de error indican el intervalo de confianza ($\alpha=0.05$).

Antes de continuar, quisimos comprobar que efectivamente estas diferentes vías de transporte desde la madre hacia la yema durante las fases S-G2, tanto para las vesículas como para los orgánulos, eran llevadas a cabo a través de los cables de actina.

2.3. El transporte de Myo2 y Sec31 desde la célula madre hacia la yema es llevado a cabo a través de los cables de actina

Para asegurarnos de que el transporte observado tanto para Myo2 como para Sec31 se realizaba a través de los filamentos de actina (transporte activo de vesículas de secreción y orgánulos, respectivamente, en el crecimiento celular polarizado (Fagarasanu and Rachubinski, 2007; Pruyne et al., 1998)), realizamos los mismos experimentos de FRAP ya

descritos en las **Figuras 16 y 17**, pero en esta ocasión hicimos uso de la Latrunculina A (Lat-A), un inhibidor que provoca la completa desorganización del citoesqueleto de actina en levaduras (Ayscough et al., 1997), tras 5 min de incubación en presencia de ésta a una concentración final de 200µM. En ambos casos, para Myo2 y para Sec31, solamente usamos el wt.

Así, con el uso de un medio conteniendo Lat-A, ésta desnaturalizaría los filamentos de actina de las levaduras y no observaríamos ningún transporte de las proteínas Myo2 y Sec31 desde la madre hacia la yema.

En esta ocasión, como solamente hicimos uso del wt con y sin Lat-A, pues queríamos ver si dicho transporte se realizaba a través de los cables de actina, representamos los valores medios de las velocidades específicas de transporte de Myo2 y de Sec31. Las mostramos relativizadas al valor del wt en DMSO (wt, sin Lat-A).

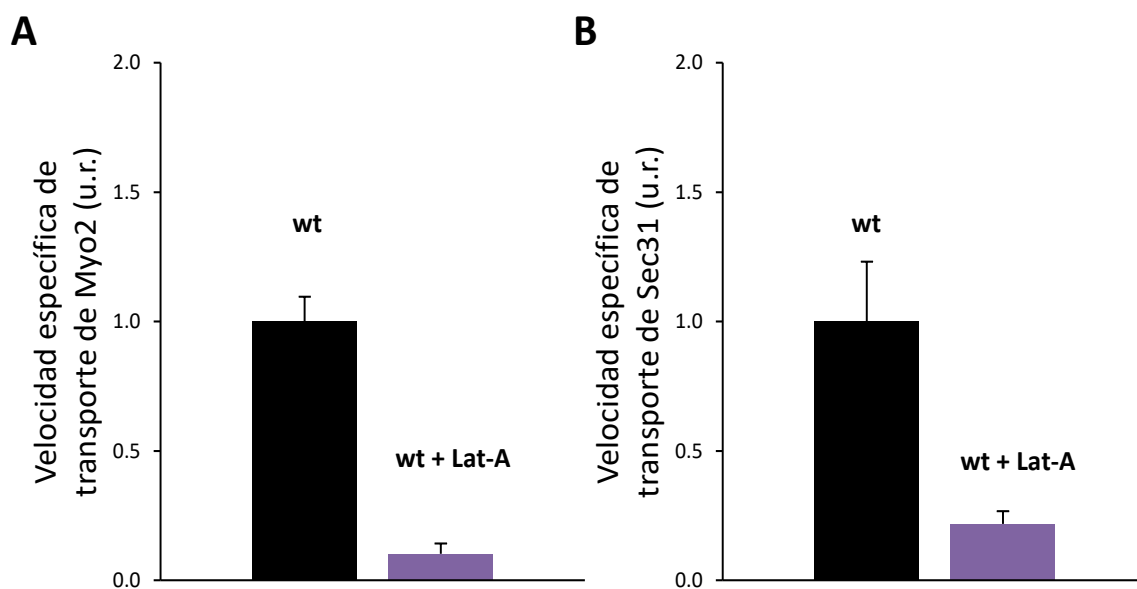


Figura 18: El transporte de Myo2 y Sec31 desde la célula madre hacia la yema es llevado a cabo a través de los cables de actina.

(A) Valores medios de la velocidad específica de transporte de Myo2 en S-G2, desde la célula madre hasta la yema, para las células wt en glucosa (n=18) y wt en glucosa conteniendo Lat-A (n=7). T-test (p -value) $<10^{-13}$.

(B) Valores medios de la velocidad específica de transporte de Sec31 en S-G2, desde la célula madre hasta la yema, para las células wt en glucosa (n=20) y wt en glucosa conteniendo Lat-A (n=17). T-test (p -value) $<10^{-6}$.

Valores relativizados con respecto al wt (en DMSO), en unidades relativas (u.r.). Concentración de Lat-A de 200µM. Las barras de error indican el intervalo de confianza ($\alpha=0.05$).

Como se observó en la **Figura 18**, para ambas proteínas vimos una fuerte dependencia de su transporte con la organización del citoesqueleto de actina, pues en presencia de Lat-A

se vieron drásticamente disminuidas sus velocidades de transporte. Para el caso de Myo2, su velocidad disminuyó un 90% con respecto al wt, y para Sec31, esta disminución fue del 80%.

Así, debido a que en presencia del inhibidor de la organización del citoesqueleto no se produjo apenas recuperación de la fluorescencia en la yema de estas proteínas fusionadas a GFP, pudimos demostrar que el transporte que estábamos anteriormente observando para el caso de Myo2 y Sec31 desde la célula madre hasta la yema no era ningún tipo de transporte inespecífico, sino que se trataba de un transporte activo llevado a cabo a través de los filamentos de actina.

A pesar de lo observado, no podemos asegurar que los factores limitantes de la velocidad de crecimiento con el volumen celular sean el transportador Myo2 o el componente Sec31. Podría ser que otro factor o factores estuvieran afectando y limitando la velocidad de transporte directa o indirectamente.

En general, podemos decir que el transporte está afectado a volúmenes de gemación grandes. Tanto las vesículas de secreción mediante Myo2, así como parte de los orgánulos tales como el RE, son transportados desde la célula madre hacia la yema en las fases S-G2 a través de los filamentos o cables de actina. Por lo tanto, lo siguiente que quisimos estudiar en relación con el transporte y al crecimiento polarizado, e imprescindible para el crecimiento de la yema, fueron los filamentos de actina .

2.4. El número de cables de actina no depende del volumen ni de la ploidía

El objetivo que teníamos en mente al observar los cables de actina era ver si éstos eran limitantes con el volumen, es decir, si existía una insuficiencia en su expresión a volúmenes celulares grandes. Para visualizar los cables de actina en levaduras, marcamos con el fluoróforo GFP a la proteína Abp140 (*actin binding protein 140*), la cual se intercala entre los monómeros que forman la estructura de los filamentos de actina (Asakura et al., 1998; Yang and Pon, 2002). Ello lo hicimos tanto en células wt haploides como en diploides, pues queríamos ver si dicho número aumentaba con la ploidía. Y de nuevo, usamos las células haploides BF305 para estudiar su dependencia con el volumen, además de para poder obtener volúmenes celulares muy grandes.

Una vez pusimos los cultivos celulares a crecer exponencialmente (para el caso de la BF305, como en anteriores ocasiones, las retuvimos por diferentes periodos de tiempo en glucosa y después las pusimos de nuevo a gemar en galactosa), obtuvimos imágenes de todas las células durante la gemación por microscopía confocal. Tras realizar una deconvolución de todas las imágenes de una misma célula, realizamos una reconstrucción en 3D para poder contabilizar fácilmente todos los filamentos de actina que iban desde la célula madre hasta la yema (**Figura 19A**).

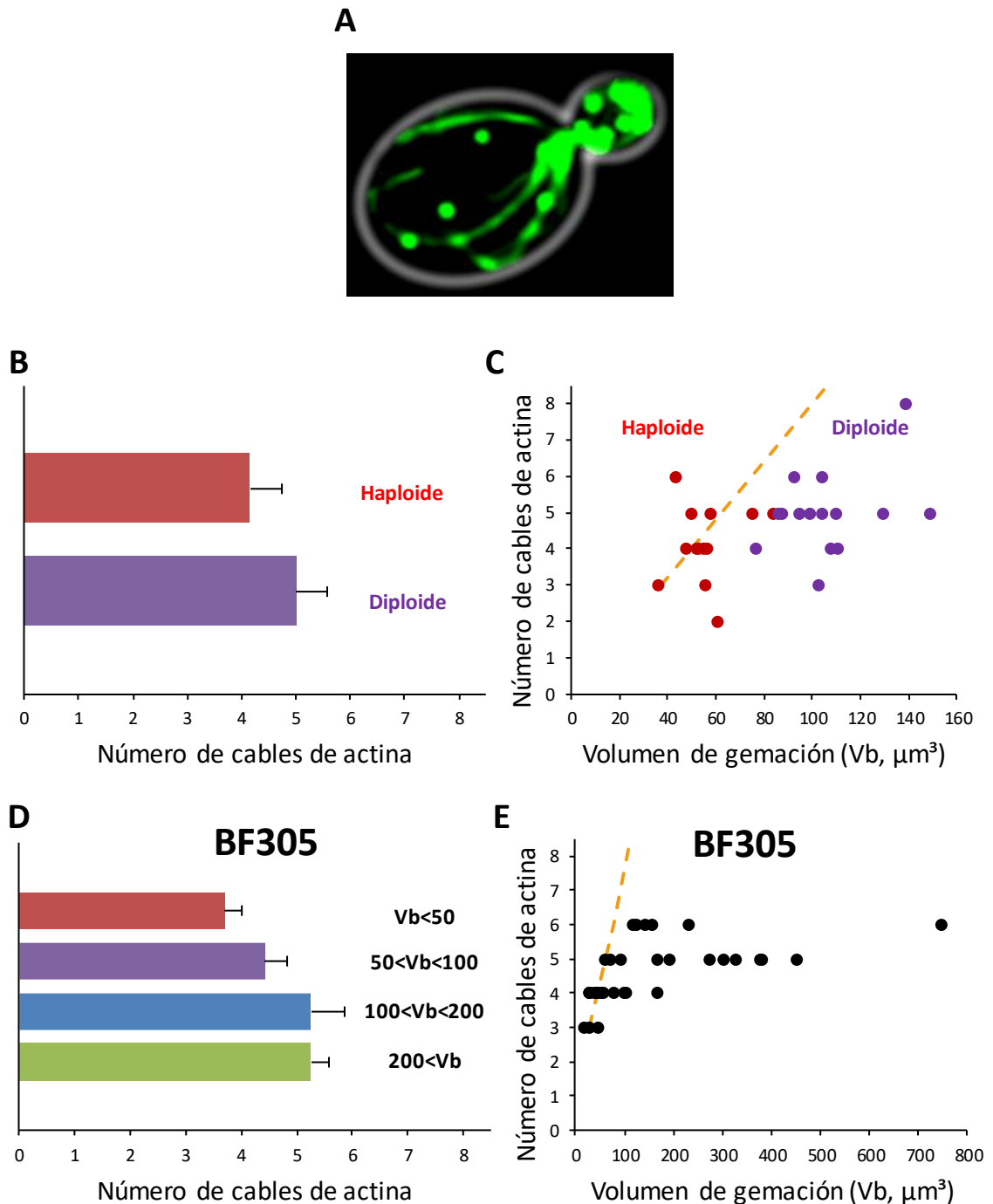


Figura 19: El número de cables de actina no depende del volumen ni de la ploidía.

(A) Observación de los filamentos de actina en una levadura en gemación mediante la proteína de fusión Abp140-GFP.

(B) Valores medios del número de cables de actina para las células haploides (n=13) y diploides (n=15). Diferencias no significativas (p -value=0.052).

(C) Número de cables de actina frente al volumen de gemación para los haploides y diploide de **(B)**.

(D) Valores medios del número de cables de actina para las células BF305 (haploides), según rango de volúmenes. $V_b < 50$ (n=10), $50 < V_b < 100$ (n=7), $100 < V_b < 200$ (n=8), y $200 < V_b$ (n=8).

(E) Número de cables de actina frente al volumen de gemación para las células BF305 de **(D)**.

Las barras de error indican el intervalo de confianza ($\alpha=0.05$).

Las líneas discontinuas amarillas indican el aumento teórico en el número de cables de actina si éstos fueran proporcionales al volumen.

En la **Figura 19B** comparamos el número de cables de actina entre las células haploides y las células diploides, mientras que en la **Figura 19C** representamos los cables de actina de esas mismas células frente al volumen de gemación. En las **Figuras 19D y E** realizamos lo mismo, pero para el caso de las células haploides del mutante BF305.

Como podemos observar en la **Figura 19**, el número de cables de actina no escala con la ploidía, pues las células haploides contenían prácticamente el mismo número de filamentos que las células diploides, aun teniendo éstas el doble de material genético. Los cables de actina tampoco escalaban con el volumen, ni para el caso de un mismo tipo celular, ni comparando a las células haploides con las diploides, con hasta el doble de volumen de gemación. Ambos tipos de células tuvieron de promedio entre 4 y 5 filamentos de actina que conectaban a la célula madre con la yema.

Para el caso de las células haploides BF305, en donde se mantenía la ploidía, pudimos obtener un rango más amplio de volúmenes de gemación. El número de cables de actina de estas células con un rango de volúmenes similar tanto a las células wt haploides como a las diploides fue prácticamente el mismo. Se podía observar que, para las células BF305, parece que el número de filamentos de actina sí va aumentando un poco con el volumen, pero no lo hacía de manera suficiente o proporcionalmente al volumen (ver línea discontinua amarilla, **Figura 19E**). Se vio que los cables de actina tampoco escalaban con el volumen para las células BF305 con tamaños celulares muy grandes.

Así, pudimos comprobar como los cables de actina no son limitantes en el crecimiento polarizado, pues el número de éstos era muy similar entre las células haploides y las diploides, e idéntico al de las células BF305 a esos mismos volúmenes. Incluso permanecía prácticamente constante cuando se aumentaba el volumen de gemación considerablemente.

Una vez conocido que el factor limitante, por el cual la velocidad específica de crecimiento en S-G2 decrecía con el volumen de gemación, no era el número de cables de actina, quisimos seguir investigando si el problema radicaba en los mecanismos de transporte o en el transporte en general. Como anteriormente habíamos observado que la velocidad de transporte de Myo2 (el transportador de las vesículas de secreción) estaba afectada a volúmenes grandes, quisimos averiguar si ello era debido a que Myo2 fuese el propio factor limitante al haber una cantidad (insuficiente) de estas proteínas no acorde a su volumen celular. Si eso fuera cierto, en el momento de la gemación, las células tendrían carencia de dichas proteínas y por ello un déficit en la velocidad de crecimiento de la yema en S-G2.

2.5. La concentración de Myo2 durante G1 no disminuye con el volumen

Para ver si realmente Myo2 era uno de los posibles factores limitantes que no escala con el tamaño celular, llevamos a cabo unos experimentos para estudiar su expresión frente al volumen. Usamos la cepa BF305 Myo2-GFP creciendo tanto en galactosa (control del crecimiento exponencial) como manteniéndolas por diferentes tiempos en glucosa, donde las

células quedaban paradas en G1 e iban aumentando de volumen con el tiempo de manera isotrópica. No las volvimos a poner en galactosa, pues queríamos conocer la concentración de Myo2 frente al volumen celular en G1. Como control, usamos BF305 Cdc28-GFP, pues Cdc28 es la única Cdk en levaduras de gemación, siendo su expresión constitutiva y manteniéndose constante su concentración a lo largo de todo el ciclo celular e incluso con el volumen celular (Mendenhall and Hodge, 1998b).

Para medir la expresión de proteína usamos un microscopio de fluorescencia. Con los valores de fluorescencia de un microscopio de campo ancho obtenemos el total de ésta, pero a volúmenes grandes nos da directamente la concentración. Por ello fue necesaria el uso de un control, Cdc28.

Primero obtuvimos la “fluorescencia neta” (*FL1-Background*) de las células BF305 (control negativo), es decir, la autofluorescencia. Y dicho valor se lo restamos a la fluorescencia neta de cada muestra, tanto para Myo2-GFP como para Cdc28-GFP, obteniendo la “fluorescencia real”. Para comparar la expresión de ambas frente al volumen, quisimos normalizar los datos de la muestra problema relativizándolos ante los datos de Cdc28.

Para ello, ajustamos los datos de Cdc28 a una función logarítmica, y mediante una regresión lineal, sacamos los datos de la pendiente y la ordenada en el origen. Así, para cada valor de volumen de la muestra problema, pudimos calcular su valor de fluorescencia para el caso de Cdc28. A continuación, dividimos la fluorescencia real a cada volumen de la muestra entre dicho valor para Cdc28, con lo que mediante ese factor estábamos comparando los valores de fluorescencia de la muestra con respecto a los de Cdc28. Finalmente, relativizamos tales factores con respecto a la media de los factores correspondientes al rango de volúmenes pertenecientes a las células creciendo exponencialmente, es decir, en galactosa (el análogo a las células wt). Llamamos a dichos valores fluorescencia normalizada, de cada muestra de estudio. En la **Figura 20** representamos todos los valores de la fluorescencia normalizada para el caso de Myo2 (relativo al control Cdc28 y a los valores de las células en exponencial) frente al volumen celular en G1.

Como podemos ver en la **Figura 20**, la concentración de Myo2 no disminuye con el volumen celular durante la fase G1, al igual que Cdc28. Y no solo eso, sino que aumenta hasta 2 y 3 veces más de media la concentración de Myo2 a volúmenes grandes. Lo que nos indica que no existiría una carencia de esta proteína transportadora de las vesículas de secreción en el momento de la gemación a tamaños celulares grandes.

El transporte de Myo2 está afectado a volúmenes grandes, pero la concentración no. Por lo tanto, la maquinaria de transporte por lo que se refiere a Myo2 no sería la responsable de las afectaciones en el transporte y la velocidad de crecimiento. Ni tampoco los cables de actina. Entonces, otra posibilidad podría ser la velocidad con la que se produce el cargo. Si el problema es el cargo, lo más probable es que sea su síntesis, y eso explicaría por qué el transporte no llega suficientemente rápido a la yema.

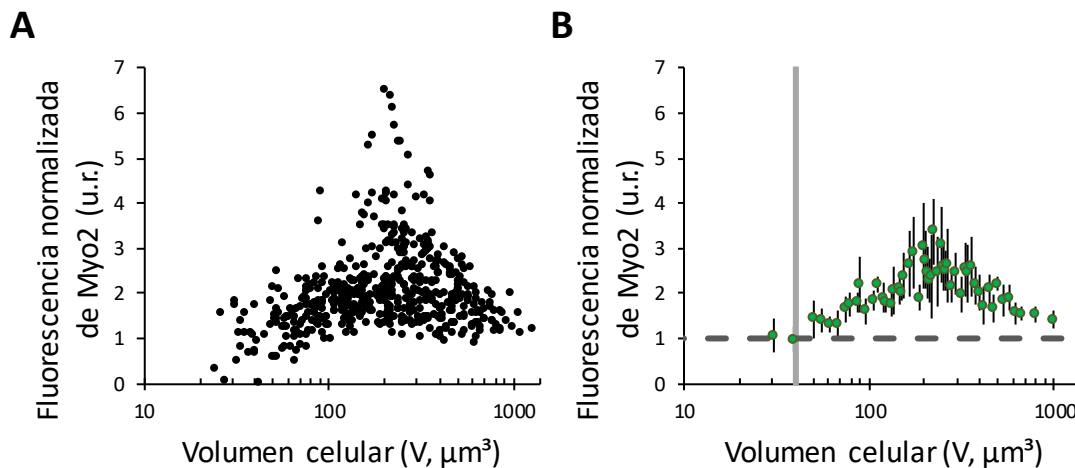


Figura 20: La concentración de Myo2 durante G1 no disminuye con el volumen.

(A) Fluorescencia normalizada para Myo2-GFP en las células BF305 durante G1 (concentración en unidades relativas, u.r.), con respecto al volumen celular (V). Cada punto representa una célula distinta ($n=518$). Todos los valores fueron relativizados con respecto a BF305 Cdc28-GFP y a las células creciendo exponencialmente.

(B) Representación de todas las células en (A), agrupándolas en *bins* o intervalos de volumen cada 10 células. La línea gris y la línea de rayas grises indican el valor medio de V y la fluorescencia de Myo2-GFP, respectivamente, para las células creciendo exponencialmente. Las barras de error indican el intervalo de confianza ($\alpha=0.05$).

Quizás la propia producción del cargo es lo que está afectada a volúmenes celulares muy grandes y ya no es tan efectiva, con relación a su tamaño. La producción de cargo transcurre desde el inicio de la transcripción hasta la salida de las vesículas por el Golgi. En primer lugar, nos preguntamos si la producción de cargo está afectada a volúmenes grandes. La manera más directa de estudiarlo es a nivel de proteína, con algunos ejemplos que tengan relación con el crecimiento polar y con el crecimiento en membrana de la yema.

2.6. La concentración de ciertas proteínas de síntesis de membrana disminuye con el volumen celular en S-G2

Como dijimos anteriormente, para estudiar qué limita al crecimiento polarizado y poder entender por qué la velocidad de éste disminuía a volúmenes grandes, no solamente podría ser debido a deficiencias en el transporte, cuya velocidad vimos que sí estaba afectada, sino también a carencias en las proteínas o componentes transportados desde la célula madre hasta la yema y necesarios para su crecimiento óptimo. Incluso debido a problemas en su síntesis en sí, es decir, a que sean las maquinarias de transcripción y traducción las que no están actuando a las velocidades adecuadas a esos volúmenes tan grandes.

Quisimos empezar estudiando algunos ejemplos de proteínas necesarias para el crecimiento de membrana pues, como ya mencionamos, justo después de la gemación

aparece un pico puntual de demanda de síntesis de membrana, al empezar a crecer la yema y haber una relación área superficial/volumen muy alta. También buscamos que su expresión esté regulada por ciclo y que tengan su máximo de expresión en la gemación o transición G1/S (Cho et al., 1998b; Colomina et al., 2009; Ferrezuelo et al., 2010; Spellman et al., 1998). Además, pensamos en escoger aquellas proteínas con una mayor expresión, no solamente para poder cuantificarlas mejor en caso de carencias a volúmenes grandes, sino porque cabe esperar que las proteínas que se están expresando en mayor cantidad en las células, sean las que también están trabajando en condiciones limitantes o a saturación, y posiblemente las que cuando las células aumenten considerablemente su tamaño, sean unas de las más afectadas.

Con los estudios de expresión consultados, se ordenaron los genes según un *score* que calculamos, el cual contenía información del nivel relativo de expresión de cada gen en estado estacionario y de su ratio pico/valle en G1/S. Decidimos seleccionar los candidatos con una cierta variedad. Así, elegimos dos proteínas del aparato de Golgi (Emp24 y Vrg4), dos proteínas relacionadas con el RE (Sur4/Elo3 y Erv25) y dos proteínas relacionadas con la glicosilación de proteínas (Psa1 y Pmi40).

Para ver si la expresión o concentración de estas proteínas escalaban o no con el volumen celular, procedimos exactamente como en el caso de Myo2, fusionando GFP a cada una de estas proteínas por separado, y haciendo uso de la cepa BF305, llevamos a cabo los mismos experimentos para estudiar su expresión frente al volumen. Como se mencionó anteriormente, con estas proteínas de membrana lo que se quería ver es si se expresaban proporcionalmente al volumen en el momento de la gemación, pues era durante la gemación y el crecimiento polar cuando realmente serían necesarias dichas proteínas. Por ello, la diferencia con el experimento de expresión de Myo2-GFP fue que, después de tener un tiempo creciendo a las células de BF305 en glucosa, las pasamos finalmente a galactosa para que empezasen a gemar de nuevo y poder estudiar la expresión de dichas células en la transición G1/S y durante las fases S-G2.

Como control volvimos a usar a BF305 Cdc28-GFP, pues su concentración se mantenía constante durante todo el ciclo. La expresión mediante fluorescencia se realizó exactamente como en el caso de Myo2-GFP. Y al igual que antes, para comparar la expresión de cada muestra frente al volumen, normalizamos los datos de la muestra problema relativizándolos ante los de Cdc28-GFP y con respecto a la media de los factores correspondientes al rango de volúmenes pertenecientes a las células creciendo exponencialmente, es decir, todo el tiempo creciendo en galactosa (el análogo a las células wt). En la **Figura 21**, representamos la fluorescencia normalizada frente al volumen de gemación para cada una de las seis proteínas seleccionadas.

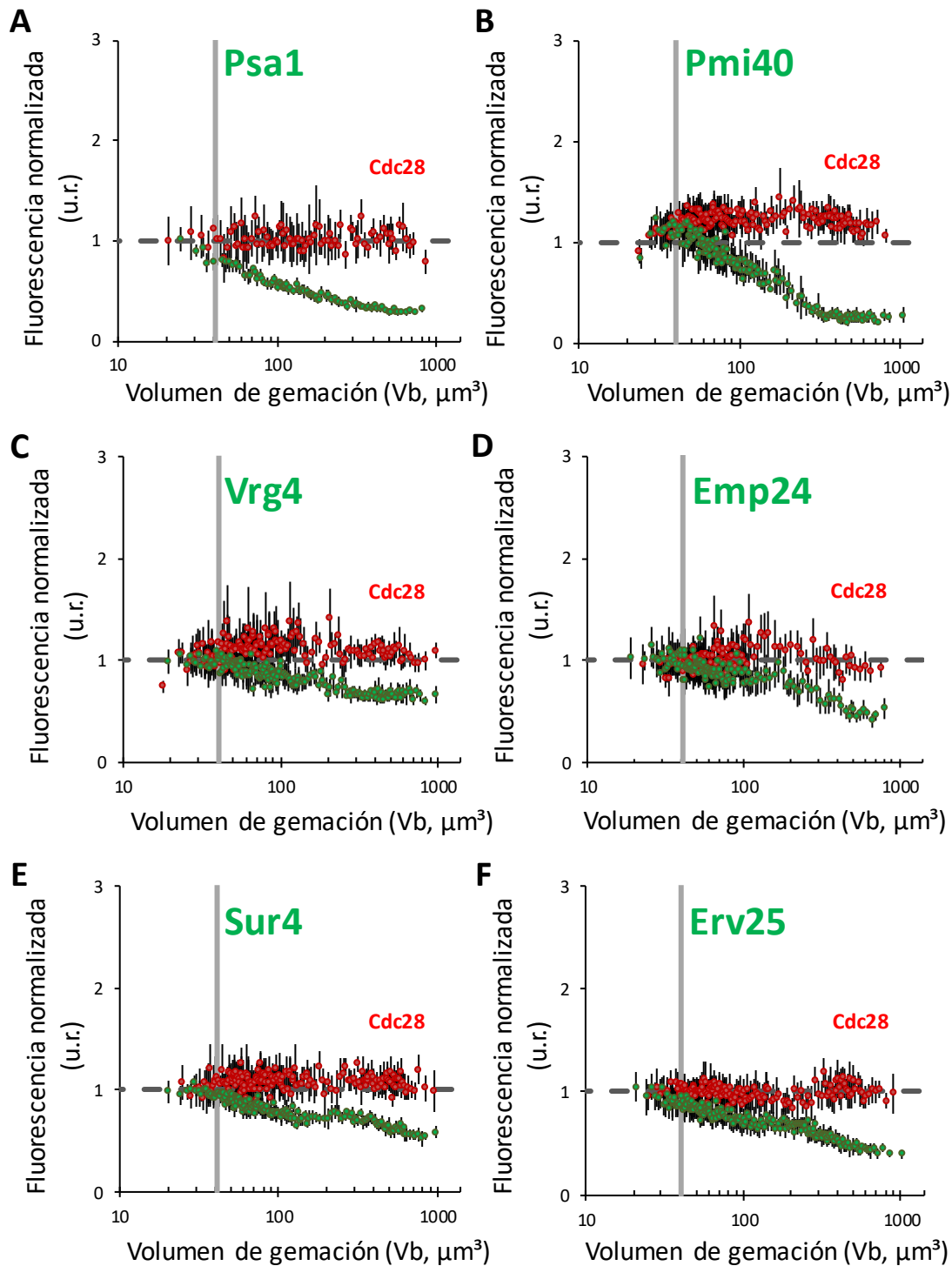


Figura 21: La concentración de ciertas proteínas de síntesis de membrana disminuye con el volumen celular en S-G2.

Representación de la fluorescencia normalizada con respecto al volumen de gemación (V_b) para cada una de las muestras (en verde) en las células BF305 durante la transición G1/S y en las fases S-G2. Para cada muestra, las células se mostraron agrupándolas en *bins* o intervalos de volumen cada 10 células. La línea gris y la línea de rayas grises indican el valor medio de V_b y la fluorescencia de cada una de las muestras, respectivamente, para las células creciendo exponencialmente. Las barras de error indican el intervalo de confianza ($\alpha=0.05$). Todos los valores fueron relativizados con respecto a BF305 Cdc28-GFP (en rojo) y a cada muestra creciendo exponencialmente.

(A) Psa1-GFP ($n=83$) frente a Cdc28-GFP ($n=81$); (B) Pmi40-GFP ($n=156$) frente a Cdc28-GFP ($n=153$); (C) Vrg4-GFP ($n=165$) frente a Cdc28-GFP ($n=158$); (D) Emp24-GFP ($n=141$) frente a Cdc28-GFP ($n=109$); (E) Sur3-GFP ($n=161$) frente a Cdc28-GFP ($n=165$); (F) Erv25-GFP ($n=174$) frente a Cdc28-GFP ($n=148$).

Observando la expresión (fluorescencia relativa y corregida) de estas proteínas frente al volumen de gemación (**Figura 21**), vimos que efectivamente la concentración de Cdc28 (en rojo) no variaba con el volumen de gemación durante la transición G1/S y S-G2. De las proteínas de membrana de G1/S (muestras en verde), todas ellas mostraron una fuerte disminución de la expresión a volúmenes grandes, pero las más afectadas fueron las proteínas solubles relacionadas con la glicosilación (Psa1 y Pmi40), las cuales además eran quienes poseían un mayor pico de expresión en G1/S.

También pudimos observar (datos no mostrados) que no existen diferencias en la expresión de ninguna de estas proteínas, ni para Cdc28, durante las diferentes fases del ciclo, las cuales en promedio se encontraban próximas a la gemación. Es decir, no existían diferencias en la expresión entre las células que se encontraban justo en la gemación (en la transición G1/S) o en las células con una yema pequeña (fase S) o mediana (fase S-G2).

Por lo tanto, pudimos comprobar que uno de los factores que estaban limitando la velocidad de transporte y del crecimiento polarizado con el volumen podían ser la síntesis de cargo. Como mencionamos anteriormente, no podemos saber si era la síntesis de estas proteínas la que estaba afectada o la maquinaria de traducción de proteínas en sí, es decir, los ribosomas. Por lo que, lo siguiente que quisimos estudiar fue la expresión de los ribosomas, y si ésta dependía o disminuía con el volumen de gemación.

2.7. La concentración de ciertas proteínas ribosomales varía muy ligeramente con el volumen celular en S-G2

Para conocer si los ribosomas se expresaban proporcionalmente al volumen celular, llevamos a cabo exactamente los mismos experimentos que en la **Figura 21**, pero para el caso de las proteínas ribosomales. Para ello, seleccionamos dos proteínas de la subunidad grande de los ribosomas (Rpl13A y Rpl19A) y dos proteínas de la subunidad pequeña (Rps0A y Rps4B).

Procedimos de la misma manera que con las proteínas de síntesis de membrana, fusionando GFP a cada una de estas proteínas por separado y haciendo uso de la cepa BF305. Después de tener un tiempo creciendo a las células de BF305 en glucosa, las pasamos finalmente a galactosa para que empezasen a gemar de nuevo y poder estudiar la expresión de dichas proteínas en la transición G1/S y durante las fases S-G2. Como control volvimos a usar a BF305 Cdc28-GFP, y para comparar la expresión de cada muestra frente al volumen, volvimos a utilizar la fluorescencia normalizada. En la **Figura 22**, representamos dicha fluorescencia frente al volumen de gemación para cada una de las proteínas ribosomales seleccionadas.

Observando la **Figura 22**, vemos que las proteínas ribosomales (muestras en verde), no muestran una clara disminución con el volumen. Para el caso de Rps0A (**Figura 22A**), pudimos observar que a volúmenes de gemación muy grandes sí que empieza a disminuir su expresión,

con lo que no se estarían produciendo en las cantidades adecuadas o proporcionalmente al volumen. Y para el caso de Rpl19 (**Figura 22D**), también se observó una pequeña disminución de su expresión con respecto a Cdc28 a volúmenes intermedios (en torno a los 100fL).

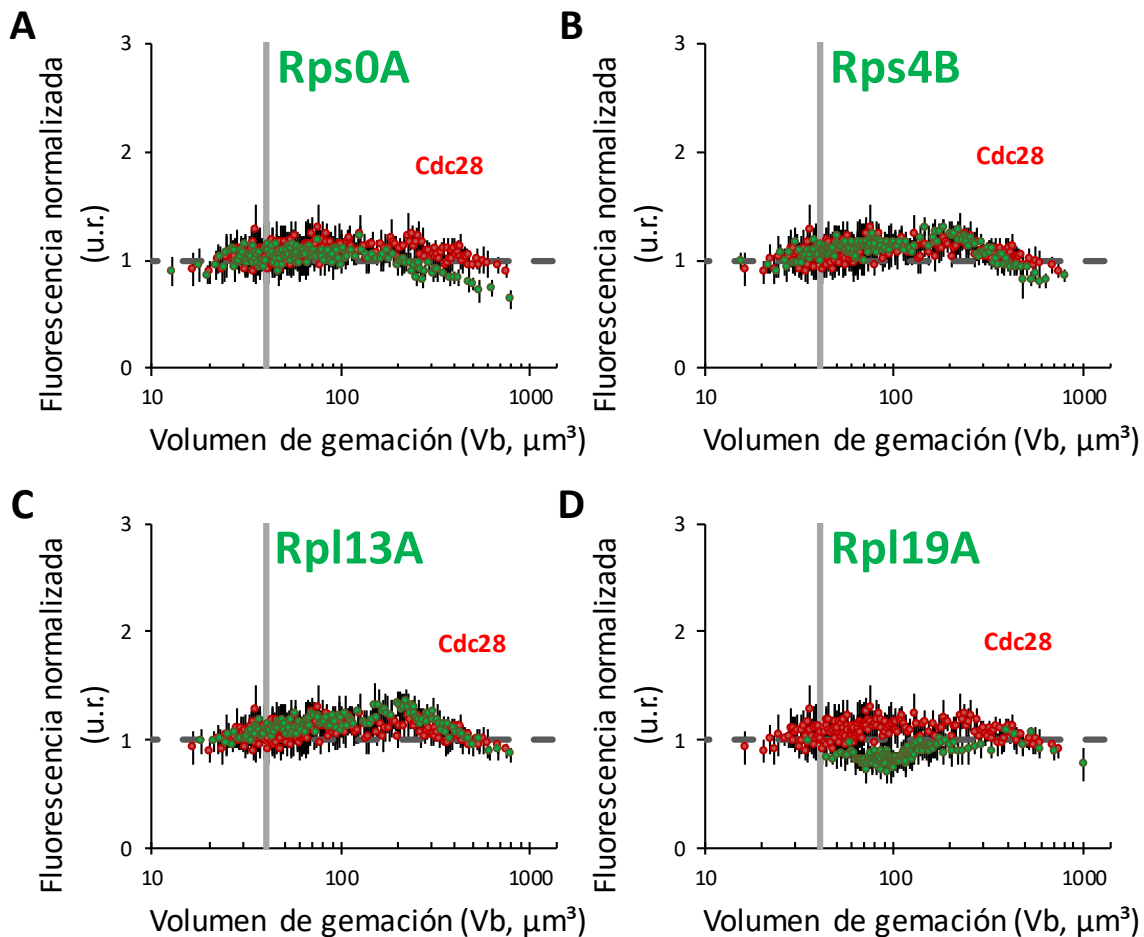


Figura 22: La concentración de ciertas proteínas ribosomales, tanto constituyentes de la subunidad pequeña como de la grande, no varía con el volumen celular en S-G2.

Representación de la fluorescencia normalizada con respecto al volumen de gemación (V_b) para cada una de las muestras (en verde) en las células BF305 durante la transición G1/S y en las fases S-G2. Para cada muestra, las células se mostraron agrupándolas en *bins* o intervalos de volumen cada 10 células. La línea gris y la línea de rayas grises indican el valor medio de V_b y la fluorescencia de cada una de las muestras, respectivamente, para las células creciendo exponencialmente. Las barras de error indican el intervalo de confianza ($\alpha=0.05$). Todos los valores fueron relativizados con respecto a BF305 Cdc28-GFP (en rojo, se usó siempre la misma muestra, $n=178$) y a cada muestra creciendo exponencialmente.

(A) Rps0A-GFP ($n=147$); (B) Rps4B-GFP ($n=147$); (C) Rpl13A-GFP ($n=142$); (D) Rpl19A-GFP ($n=113$).

Recordamos que esto solamente fue una primera aproximación para estudiar lo que sucede en algunas de las muchísimas proteínas ribosomales que existen formando parte de los ribosomas. Hemos estado estudiando la expresión de todos estos genes a nivel de proteína, de traducción. Pero sería muy tedioso encontrar exactamente todas las proteínas que tuvieran problemas a volúmenes grandes, pues podrían estar involucrados varios

procesos biológicos diferentes, y este tipo de ensayos se llevan a cabo proteína por proteína. Y aunque en algunos sí que hemos visto una clara deficiencia en su expresión proteica a volúmenes grandes, pero no sabemos exactamente cuanta sería su expresión a nivel de RNA, y si ésta podría estar también afectada y haber diferencias en la expresión entre las células grandes y las pequeñas. Por lo que sería bueno estudiar también dichas diferencias a nivel de expresión del mRNA.

En resumen, como hemos ido viendo hasta ahora, lo que podría estar limitando la velocidad de crecimiento de la yema en S-G2 con el volumen podría ser la insuficiencia en la expresión de genes relacionados con el crecimiento polar y la traducción. Por estas razones decidimos estudiar diferencias en la expresión génica a nivel transcriptómico.

3. Diferencias en la expresión de RNA entre células grandes y pequeñas

Para poder conocer qué genes se estaban expresando de manera deficitaria durante el crecimiento polar, y no proporcionalmente a su volumen celular, quisimos estudiar si existían diferencias en el proceso de la transcripción génica en células grandes con respecto a células pequeñas. Para ello, llevamos a cabo un análisis de RNAseq, tras la extracción y purificación del RNA total de las diferentes muestras, por triplicado, tanto para células grandes como para las células pequeñas durante la transición G1/S.

3.1. Volúmenes de gemación claramente diferenciados entre las muestras grandes y pequeñas para RNAseq

De nuevo, hicimos uso de la cepa BF305. En esta ocasión queríamos solamente dos tipos de células según su tamaño, células grandes y células pequeñas. Tras un cultivo exponencial en galactosa, sacamos tres muestras para ponerlas a crecer separadamente en glucosa durante 1.5h (éstas fueron las muestras de células pequeñas, S1, S2 y S3), y tres muestras en glucosa durante 8h (muestras grandes, L1, L2 y L3), donde las células quedaron paradas en G1 y fueron aumentando en volumen de manera isotrópica. Tras ese período de tiempo en glucosa, fueron puestas de nuevo en galactosa para permitir su entrada al ciclo celular. Cuando alrededor del 50% de la población se encontraba gemando (transición G1/S), se procedió a la toma de las muestras, a la extracción y purificación de su RNA y, posteriormente, a su envío para obtener la secuenciación y poder realizar el análisis de RNAseq. Después de la toma de las muestras, y antes de la extracción de su RNA, comprobamos los volúmenes celulares de cada muestra por microscopía, para corroborar que los RNA a extraer perteneciesen a las muestras con el tamaño deseado (**Figura 23**).

En la **Figura 23** podemos comprobar que la toma de las muestras fue correcta, que las réplicas fueron prácticamente idénticas y que el volumen de gemación medio de las muestras grandes (520fL) fue de unas diez veces mayor que el volumen medio de las células pequeñas (58fL). Aunque las células pequeñas estuvieron paradas en glucosa, al igual que las grandes, para poder sincronizarlas y poder estudiar su expresión de RNA en el momento de la transición G1/S, su volumen de gemación fue cercano a las células de BF305 creciendo exponencialmente (42fL).

Antes del envío de las muestras para su secuenciación, comprobamos el estado de las muestras de RNA mediante geles de agarosa (**Figura 24A**) y medimos su concentración mediante un espectrofotómetro (**Figura 24B**).

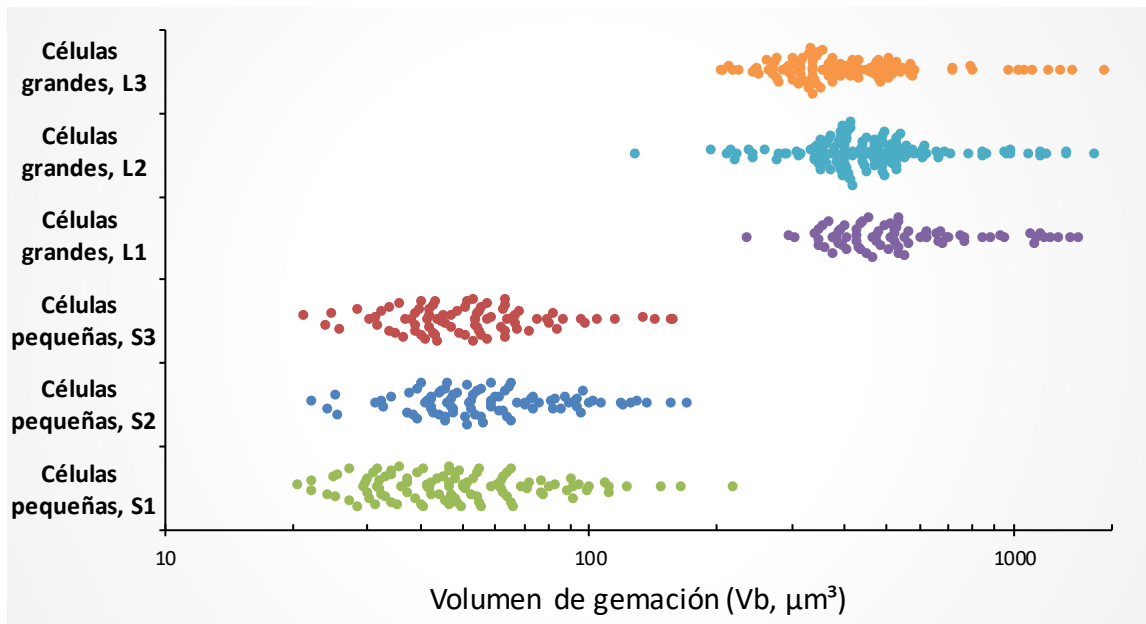


Figura 23: Volúmenes de gemación claramente diferenciados entre las muestras grandes y pequeñas para RNAseq.

Volúmenes de gemación de todas las muestras para RNAseq. Las células grandes fueron paradas por 8h en glucosa y puestas de nuevo en galactosa por 2h para su gemación. Las células pequeñas fueron paradas por 1.5h en glucosa y puestas de nuevo en galactosa por 1.5h para su gemación. L3 (n=119), L2 (n=147), L1 (n=80), S3 (n=86), S2 (n=89), S1 (n=105).

En la **Figura 24A**, podría parecer que las muestras son algo diferentes tras su análisis en el gel de agarosa, pero fueron prácticamente iguales. Ello fue debido a la diferencia en la tinción del gel de agarosa, y no a diferencias en las muestras. Como se puede apreciar en el primer y último carril del gel de agarosa, correspondientes a los marcadores de peso molecular, existe una clara diferencia en la intensidad de las bandas, aunque ambos marcadores son exactamente iguales en composición y concentración.

En la **Figura 24B** se puede observar que las seis muestras fueron prácticamente idénticas en cuanto a la concentración de RNA como a su calidad, medida como ratios A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . Por lo que pudimos concluir que la toma de las diferentes muestras fue correcta, al igual que la calidad de la extracción de RNA. Las réplicas estaban bien realizadas y las células pequeñas y las grandes tenían tamaños bien diferenciados.

Tras dicha comprobación, enviamos las muestras a secuenciar a la empresa “LC Sciences”, donde volvieron a comprobar que éstas eran de la calidad exigida, avisándonos que efectivamente fue así para todas las muestras y de manera prácticamente idéntica. La secuenciación se llevó a cabo según la metodología *Illumina*:

preparación de la librería → generación de un clúster → secuenciación → análisis de datos

Como resultado de la secuenciación, nos enviaron un fichero en formato FASTQ con las secuencias de todos los *reads* para cada una de las muestras enviadas. Nosotros realizamos el análisis e interpretación de los datos de RNAseq.

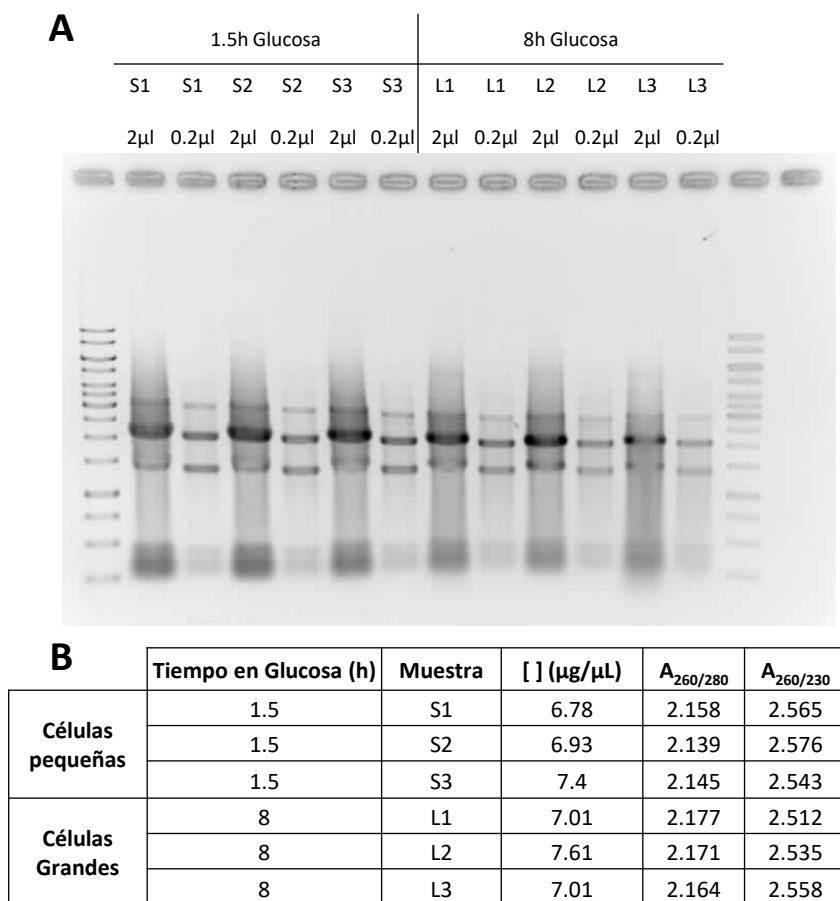


Figura 24: Análisis y cuantificación de las muestras para RNAseq.

(A) Gel de agarosa de las muestras para RNAseq. Para cada muestra se cargaron dos carriles (uno con 2 μ L de muestras y el otro con 2 μ L de una dilución 1:10).

(B) Cuantificación de las muestras de RNAseq mediante espectrofotómetro. Para la secuenciación fueron enviados 25 μ g de cada muestra.

La secuencia de análisis de los datos de RNAseq que llevamos a cabo fue:

RobiNA → Perseus → GSEA

3.2. Alrededor del 96% de los *reads* fueron correctamente mapeados en el transcriptoma de *Saccharomyces cerevisiae*

Una vez tuvimos los datos de la secuenciación, con RobiNA realizamos un control de la calidad y un procesado de todas las secuencias o *reads* analizados, y finalizamos con un alineamiento de éstos al genoma de referencia (*Saccharomyces cerevisiae*), pues dicho programa nos permitió hacer todo el mapeado de los *reads*.

El resultado obtenido fue que alrededor del 96% de los *reads* fueron correctamente mapeados en el transcriptoma de *S. cerevisiae*, de un total de aproximadamente 70 millones

de *reads* (unos 10 millones por muestra). De las seis muestras, las cuales eran las tres réplicas de las células pequeñas (S1, S2 y S3) y las tres réplicas para las muestras grandes (L1, L2, L3), tuvimos que repetir el análisis para la muestra L3, pues mostraba ciertas diferencias frente a las otras dos réplicas, quedándonos finalmente con la repetición de dicha muestra. A esta última la llamamos L3re.

Lo que obtuvimos del análisis de RNAseq fue una tabla con los *reads* para todos los genes secuenciados de cada una de las seis muestras. Para seguir con el análisis y procesado de la calidad de las muestras, y no solamente de los *reads*, usamos el programa Perseus, con el cual a partir de los *reads* de cada gen y de cada muestra, obtendríamos sus *reads* relativos, es decir, los *reads* secuenciados que realmente le pertenecen a cada gen.

3.3. Las muestras de RNAseq producen resultados coherentes por grupo

Como dijimos, decidimos relativizar los datos de los *reads*, pues no sabemos el número de moléculas de RNA secuenciadas por célula o por volumen. Por ello, normalizamos los valores de cada muestra por ella misma, con lo que cada gen tendría un valor dado por su FPKM (fragmentos o *reads* por *Kilobase* y por millón de *reads*).

Pasos a seguir con Perseus:

Clasificación de muestras (3xS y 3xL) → T-test → \log_2 → Ratio de \log_2 (L/S) → Reemplazar valores #NA → Visualización de resultados: PCA y *HeatMap* (*clustering*)

Lo primero que hicimos con Perseus fue clasificar las muestras en categorías (grandes o pequeñas) para poder hacer estadística. A partir de los *reads* obtuvimos su valor de FPKM para cada gen, y a partir de éste sacamos un *score* dado tras aplicarle la operación \log_2 . Con ello, ya podíamos obtener los ratios o diferencias de expresión entre las células grandes (L) y las células pequeñas (S). Para calcular esas ratios, solamente teníamos que restar desde las medias el valor de las células pequeñas al de las grandes. Así, para cada gen tuvimos su valor de \log_2 (L/S) y un p-value, para ver si esas diferencias eran significativas.

Después, realizamos una purga o limpieza, para reemplazar algunos fallos (NA#) que se encontraron en la lectura de los *reads* de algunos genes en algunas muestras. Finalmente, procedimos a la visualización de los datos y al control de la calidad de los resultados mediante análisis de componentes (PCA, **Figura 25A**) y *clustering* (**Figura 25B**).

Las gráficas de PCA muestran y agrupan las diferentes muestras del sistema según las características y similitudes de sus componentes. Cada componente es una propiedad que permite definir las muestras. Según la **Figura 25A**, podemos ver que existían dos grupos bien definidos y diferenciados, con tres muestras cada uno de ellos. Y efectivamente, éstas se agruparon según el tipo de células de que se trataba, es decir, las tres réplicas de células grandes por un lado y las tres réplicas pequeñas por otro.

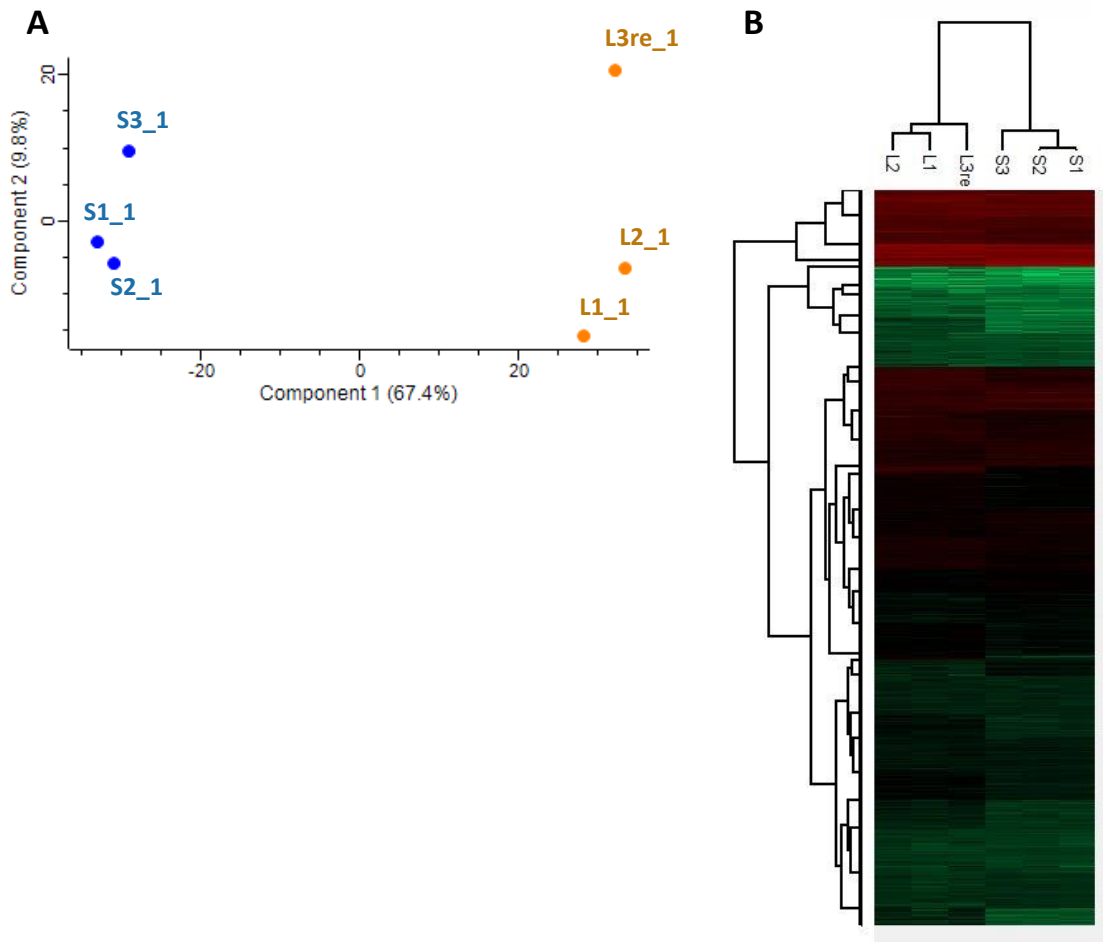


Figura 25: La calidad de las muestras de RNAseq fue buena.

(A) Visualización del control de la calidad de los datos de las diferentes muestras de RNAseq mediante la representación de dos de sus componentes, a través del gráfico PCA. L: muestras de células grandes (naranja). S: muestras de células pequeñas (azul).

(B) Visualización del control de la calidad de los datos de las diferentes muestras de RNAseq mediante *HeatMap* o *clustering*. En rojo se muestran los genes de mayor expresión, mientras que en verde se muestran los genes de menor expresión.

En la **Figura 25B**, en el eje de abscisas se ordenaron las muestras por su similitud, mientras que en el eje de ordenadas se agruparon los genes por su comportamiento, no por las diferencias entre sus clases, ni teniendo en cuenta su nivel de expresión. Pudimos observar un alto grado de homogeneidad en el *clustering* o nivel de expresión entre las muestras de cada subconjunto. Había algunas zonas con una homogeneidad muy clara, es decir, hay genes que estaban regulados, pero lo estaban siempre, independientemente del tipo de muestra. Mientras que, en otras regiones, vimos genes que sí que se comportaban distinto según el tipo de muestra, según al subconjunto al que perteneciese. Es decir, cuando había diferencias, las tres muestras de células pequeñas eran muy distintas a las tres muestras de células grandes, pero no encontramos una única muestra o columna que se diferenciase claramente de las demás. Por lo que las réplicas pudieron ser consideradas como perfectamente válidas para continuar con su análisis de expresión por RNAseq.

Hay que destacar de nuevo que, tras el análisis y visualización de los datos por Perseus, el programa fue capaz de ordenar y agrupar las muestras en dos subgrupos. Pues existen comportamientos más similares entre las muestras de células pequeñas, que con las células grandes. Perseus hizo su propia clasificación de las muestras y vimos que ésta fue exactamente como esperábamos. Por un lado, está el grupo de las tres réplicas de células pequeñas, y por otro lado están las tres réplicas de células grandes.

Siguiendo con el análisis de Perseus, después de ver la calidad de las muestras, la cual pudimos comprobar que fue satisfactoria, continuamos con un t-test de los valores o *scores* de \log_2 de todos los genes para cada muestra, para finalmente representar los datos mediante las gráficas de MA (**Figura 26A**) y Volcano (**Figura 26B**). Al igual que en la gráfica de *clustering*, indicamos en un color rojo los genes de mayor expresión y en verde los genes de menor expresión. Como dijimos anteriormente, mediante Perseus convertimos los *reads* en scores y a partir de entonces se trabajó con éstos para el análisis de RNAseq propiamente dicho. En gris se mostraron aquellos genes cuya expresión diferencial entre las células grandes y las pequeñas no era significativa (según el *q-value*).

Las gráficas de MA y de Volcano son dos maneras de representar algo muy similar, pero de manera complementaria. En la gráfica de MA se representa para cada gen el \log_2 de la ratio de la expresión de las células grandes (L) entre las pequeñas (S) frente al producto (L*S). Con ello podemos observar si existe una dependencia de nuestro enriquecimiento (expresión de genes en células grandes frente a las pequeñas) con los genes de mayor o menor expresión en general en todas las células. Es decir, cuanto mayor es el producto L*S, mayor es su nivel de expresión.

En la **Figura 26A** no se observa ninguna tendencia clara. Es decir, no son los genes más expresados los que muestran una expresión más diferenciada entre las células grandes y las pequeñas. Observamos genes que se expresaban poco y que había diferencias de expresión entre las muestras grandes y pequeñas, y genes que se expresan mucho y que también las había. Mientras que en la **Figura 26B**, tanto para la expresión diferencial enriquecida en las células grandes frente a las pequeñas, como al revés, con un enriquecimiento en las células pequeñas, en ambos encontramos valores significativos para multitud de genes. Por lo que las muestras pudieron considerarse de una calidad adecuada, con una distribución homogénea entre la expresión diferencial y la cantidad total expresada por cada gen. Así, no fue necesaria ningún tipo de normalización adicional de los datos de las muestras de RNAseq.

Resultó importante comprobar si nuestras células efectivamente se encontraban en promedio en el momento de la transición G1/S, pues es cuando quisimos comparar entre las expresiones de mRNA entre las células grandes y pequeñas, al ser en ese momento cuando empezaría a haber una mayor demanda para el crecimiento apical de la yema.

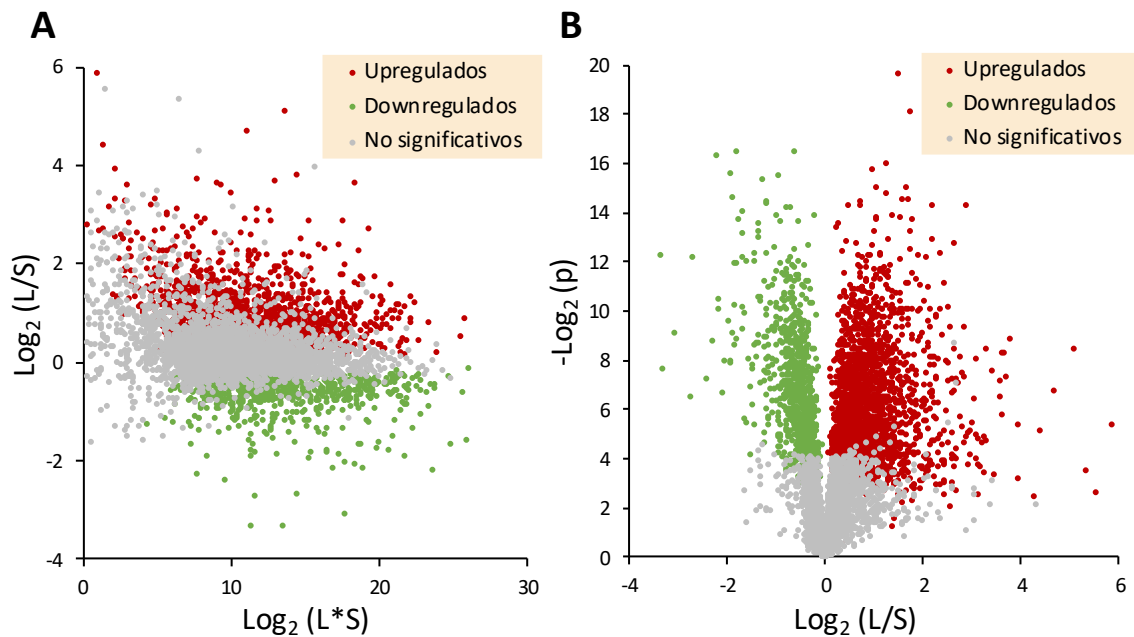


Figura 26: Visualización de los datos de RNAseq mediante MA y Volcano.

(A) Representación MA de la ratio de la expresión diferencial entre células grandes y pequeñas ($\text{log}_2(L/S)$) frente a la expresión total ($\text{log}_2(L*S)$) de las muestras de RNAseq.

(B) Representación Volcano del p -value frente a la ratio de la expresión diferencial entre células grandes y pequeñas ($\text{log}_2(L/S)$) de las muestras de RNAseq.

En rojo se muestran los genes de mayor expresión, mientras que en verde se muestran los genes de menor expresión. En gris se mostraron los genes cuya expresión diferencial fue no significativa (q -value). L: muestras de células grandes. S: muestras de células pequeñas.

3.4. Las muestras de RNAseq fueron obtenidas durante la transición G1/S

Para ver en qué momento del ciclo celular se encontraban las muestras de RNAseq, comparamos la expresión de nuestras células pequeñas (S) y grandes (L) frente a la de muestras asincrónicas (células en diversas fases del ciclo celular) (Figura 27), de un experimento de expresión génica publicado por otro laboratorio. Para ello, mostramos solamente los genes regulados por ciclo (unos 700) y los ordenamos según el momento en el cual muestran su pico de expresión, según el trabajo de *Spellman*: M/G1, G1, S, S/G2, y G2/M.

Representamos la expresión relativa entre cada muestra. Se calculó para cada gen el *score* de su expresión dividido entre la expresión de dicho gen de manera asincrónica, y luego se calculó su media para cada tipo de muestra (pequeñas y grandes) y relativo a la expresión media de todos los genes para cada muestra. Cada punto en la figura muestra la agrupación por *bins* o intervalo de unos 36 genes regulados por ciclo y con una ordenación correlativa según el momento de su pico de expresión, representando el valor medio de la expresión de esos genes para nuestras muestras de RNAseq frente a la de las muestras asincrónicas. Cada punto se mostró con sus barras de error indicando el error estándar. Y como ordenamos a dichos genes según su momento de máxima expresión a lo largo del ciclo, veríamos si nuestras

muestras realmente indicaban un aumento de expresión génica en el momento de la gemación, es decir, en la transición G1/S.

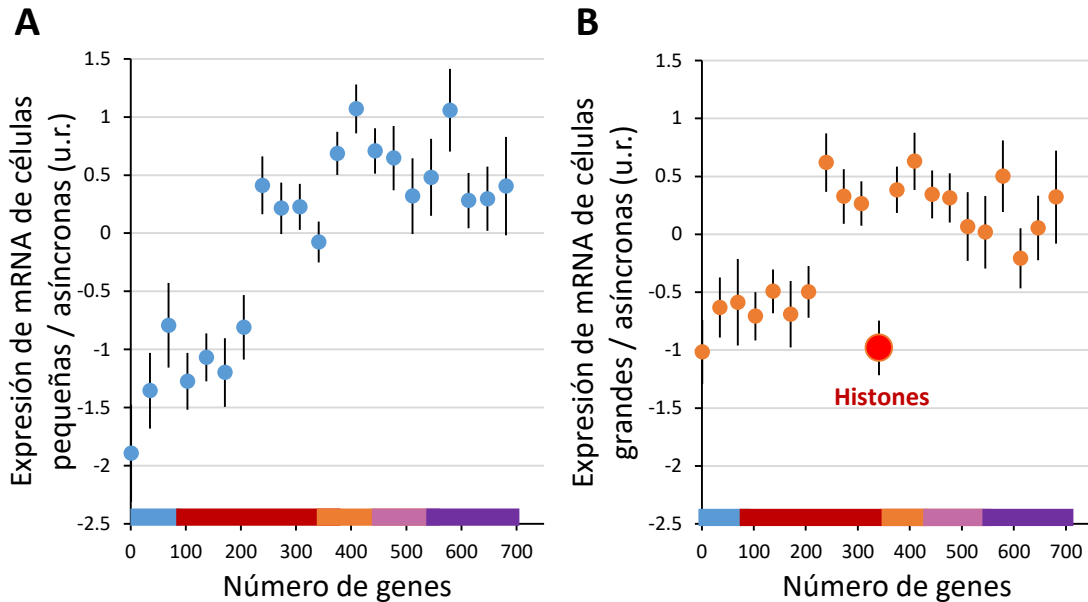


Figura 27: Las muestras de RNAseq fueron obtenidas durante la transición G1/S.

(A) Representación de la expresión de mRNA de los genes regulados por ciclo de las muestras de células pequeñas (azul), relativo a la expresión de células asíncronas (en unidades relativas, u.r.)

(B) Representación de la expresión de mRNA de los genes regulados por ciclo de las muestras de células grandes (naranja), relativo a la expresión de células asíncronas (en unidades relativas, u.r.). Ambos casos se representaron a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular: M/G1 (azul), G1 (rojo), S (naranja), S/G2 (rosa), y G2/M (violeta). Los genes están agrupados en *bins* cada 36 genes y ordenados según el momento de su máxima expresión. Las barras de error indican el error estándar.

En la **Figura 27** vemos que las muestras de células pequeñas y grandes se comportaron igual. La expresión de los genes M/G1 y los de G1 tempranos de nuestras muestras estaban empobrecidos con respecto a las células asíncronas. Pero vimos la existencia de un punto de inflexión con el aumento en la expresión de nuestras muestras justamente en la transición G1/S. Así, pudimos comprobar que nuestras células para el experimento de RNAseq efectivamente estaban expresando genes G1/S, y por ello justo a partir de START fue cuando aumentó la expresión de esos genes. Nuestras células estaban en promedio entrando en fase S, y tendrán inducidos todos los genes de G1/S y START, pero no los de G1 ni los de M/G1. Los genes a partir de G1/S también aumentaron. Eso quiso decir que nuestros experimentos no tenían una sincronización del 100% (se dice que en promedio estaban en G1/S). Pero, también es debido a que, por ejemplo, los genes de Mitosis (G2/M) empiezan a expresarse en G2 temprana. Con lo cual, con que en nuestras muestras existan células que acaban de terminar la fase S, que suele ser entre 20 y 40 minutos después de la gemación, dependiendo de la célula, pues ya habría células expresando dichos genes de mitosis.

Así, ambos grupos de células, las grandes y las pequeñas, tuvieron el mismo comportamiento, pues ambos tipos de muestras las recogimos en el mismo momento, cuando aproximadamente el 50% de las células estaban gemando, es decir, en la transición G1/S. Pero sí que encontramos una pequeña diferencia y fue que, en las muestras de las células grandes, el bloque de las histonas, al expresarse todas ellas en un momento parecido del ciclo celular, y según la ordenación de Spellman, pudimos observarlas prácticamente a todas ellas en el mismo *bin*. Ello fue debido a que en las células grandes no existe una mayor expresión de las histonas, con lo que su expresión relativa al tamaño celular decae al compararla con la expresión de las células asíncronas creciendo exponencialmente.

Una vez visto el procedimiento de análisis de RNAseq y la calidad de éste, fuimos a estudiar e interpretar el análisis de RNAseq propiamente dicho y a comparar las diferencias entre las muestras de células grandes y pequeñas.

3.5. Determinadas categorías funcionales muestran una expresión génica alterada en células grandes frente a pequeñas

En la **Figura 26B** vimos que entre nuestras muestras existían multitud de genes mucho más expresados en las células grandes con respecto a las pequeñas, y viceversa. No es fácil interpretar ese tipo de resultados, ni mucho menos estudiar gen por gen y querer extraer directamente conclusiones mecanísticas sobre su función biológica. Un procedimiento muy usado es estudiar los genes por conjuntos, por categorías (Lun et al., 2016), y ver si dichas categorías están enriquecidas en genes expresados diferencialmente en las células grandes o en las pequeñas. El objetivo de ello es poder comprender en qué vías o conjuntos de genes están implicados los genes expresados diferencialmente en un tipo de células frente a otro, y no tratar los genes individualmente, uno a uno.

Para ello, usamos el software GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) desarrollado por el Broad Institute (Mootha et al., 2003; Subramanian et al., 2005). Éste es un método computacional que determina si un conjunto de genes definido a priori muestra diferencias estadísticamente significativas entre dos muestras biológicas o fenotipo, en nuestro caso entre las muestras grandes y las pequeñas.

Para las clasificaciones o categorías de genes, usamos las categorías de *GO_term* para *Saccharomyces cerevisiae* S288c (taxon 559292) según (1) el componente celular, (2) la función molecular y (3) el proceso biológico en que intervienen.

A partir de las listas de los datos de expresión de las diferentes muestras, conteniendo el nombre y los fpkm (o *scores*) para los más de 6000 genes de cada una de ellas, con el GSEA obtuvimos unas nuevas listas con un nuevo *score* para cada gen. A partir de dicha lista, con el GSEA pudimos clasificarlos todos ellos en algo más de 1500 categorías de *GO_term* y obtener un análisis estadístico completo. Para cada categoría se indicó el nombre y número de genes

que la contienen, su valor de NES (*normalized enrichment score*) y la probabilidad FDR (*false discovery rate*), entre otros parámetros. Dada esta lista de todas las categorías, las filtramos para seleccionar solamente aquellas que tuvieran un $FDR < 0.05$ (5%). Una vez hecho esto, reagrupamos las categorías, pues existían algunas muy relacionadas y bastante similares, y a continuación las clasificamos según la nomenclatura *GO_term*, es decir, según pertenecieran a la categoría de proceso biológico, componente celular o función molecular. Ello lo realizamos tanto para nuestro experimento de expresión diferencial según tamaño (células grandes frente a células pequeñas), como para otros dos experimentos que de manera indirecta estaban también comparando células grandes y pequeñas, pero por otros motivos, por comparación de células por ploidía (4n frente a n (Wu et al., 2010)) y según su velocidad de crecimiento (células con crecimiento rápido frente al lento (Slavov and Botstein, 2011)).

Así, realizamos dichos análisis mediante el uso de GSEA y obtuvimos unas representaciones mediante *barcodes* o códigos de barras (**Figura 28**). Como se mencionó, esto se realizó tanto para nuestro experimento, mostrando la ratio de la expresión de células grandes frente a las pequeñas, como para otros dos experimentos. En uno de esos dos experimentos, estudiaron las pendientes medias como una función de la velocidad de crecimiento (Slavov and Botstein, 2011), es decir, analizaron la expresión de las células que crecían rápido frente a células que crecían lento mediante el control de los cultivos en un quimioestado. El otro experimento fue llevado a cabo por (Wu et al., 2010), en el que analizaron la relación entre la expresión génica y la ploidía, comparando ésta para células tetraploides (4n) frente a la de células haploides (n).

Con estas representaciones de códigos de barras, mostramos los resultados obtenidos para los tres experimentos mencionados anteriormente, representando solo las categorías de *GO_term* con un enriquecimiento significativo para nuestro experimento de expresión por tamaño, y usamos esas mismas categorías para mostrar los enriquecimientos de los otros dos experimentos.

En la **Figura 28**, cada barra vertical (de ahí el nombre de gráficas de códigos de barras) representaba un gen dentro de la categoría indicada. Las categorías con los genes en naranja fueron las que estaban enriquecidas significativamente en las células grandes (o en las células de crecimiento rápido, o en los tetraploides), es decir, los genes de esas categorías estarían más expresados en las células grandes frente a las pequeñas. Mientras que los genes de las categorías en azul estaban enriquecidos en las células pequeñas (o en las células de crecimiento lento, o en los haploides) o, lo que es lo mismo, esos genes estaban más expresados en las células pequeñas frente a las grandes. Las categorías con los genes en gris no fueron estadísticamente significativas para dicho análisis, con lo que respecta al valor del *score* de los genes que la contienen y su NES. Es decir, fueron categorías con un $FDR < 0.05$ (5%).

A

Categorías GO_term: Componente Celular	Células pequeñas	Células grandes	NES	FDR
SMALL_RIBOSOMAL_SUBUNIT			-3.26	0.00E+00
CELL_PROJECTION_PART			-2.87	0.00E+00
DNA_PACKAGING_COMPLEX			-2.76	0.00E+00
LARGE_RIBOSOMAL_SUBUNIT			-2.61	0.00E+00
ACTIN_CYTOSKELETON			-2.36	8.28E-05
SLIK_SAGA_LIKE_COMPLEX			-2.33	7.70E-05
RSC_COMPLEX			-2.18	1.26E-03
COATED_VESICLE_MEMBRANE			-2.10	2.66E-03
MEMBRANE_RAFT			-1.99	6.69E-03
CELLULAR_BUD_TIP			-1.99	6.62E-03
PROTEASOME_REGULATORY_PARTICLE			-1.86	1.46E-02
RIBONUCLEOPROTEIN_GRANULE			-1.82	1.75E-02
TRANSPORT_VESICLE_MEMBRANE			-1.76	2.47E-02
TRANSCRIPTION_FACTOR_TFIID_COMPLEX			-1.71	3.05E-02
REPLICATION_FORK_PROTECTION_COMPLEX			-1.70	3.29E-02
PROTEASOME_COMPLEX&STORAGE_GRANULE			-1.67	3.76E-02
CORTICAL_ENDOPLASMIC_RETICULUM			-1.66	4.10E-02
REPLISOME			1.66	2.99E-02
NUCLEOLUS			1.76	1.22E-02
CYTOCHROME_COMPLEX			2.16	0.00E+00

B

Categorías GO_term: Componente Celular	Haploides	Tetraploides	NES	FDR
SMALL_RIBOSOMAL_SUBUNIT			1.16	4.31E-01
CELL_PROJECTION_PART			0.93	8.21E-01
DNA_PACKAGING_COMPLEX			1.51	1.55E-01
LARGE_RIBOSOMAL_SUBUNIT			1.10	5.16E-01
ACTIN_CYTOSKELETON			1.37	2.24E-01
SLIK_SAGA_LIKE_COMPLEX			1.10	5.20E-01
RSC_COMPLEX			1.68	8.76E-02
COATED_VESICLE_MEMBRANE			0.95	7.86E-01
MEMBRANE_RAFT			1.02	6.74E-01
CELLULAR_BUD_TIP			1.17	4.10E-01
PROTEASOME_REGULATORY_PARTICLE			1.39	2.12E-01
RIBONUCLEOPROTEIN_GRANULE			1.45	1.91E-01
TRANSPORT_VESICLE_MEMBRANE			0.91	8.46E-01
TRANSCRIPTION_FACTOR_TFIID_COMPLEX			1.52	1.52E-01
REPLICATION_FORK_PROTECTION_COMPLEX			1.68	8.42E-02
PROTEASOME_COMPLEX&STORAGE_GRANULE			1.32	2.49E-01
CORTICAL_ENDOPLASMIC_RETICULUM			0.69	9.95E-01
REPLISOME			1.31	2.57E-01
NUCLEOLUS			1.39	2.12E-01
CYTOCHROME_COMPLEX			1.33	2.45E-01

C

Categorías GO_term: Componente Celular	Crecimiento lento	Crecimiento rápido	NES	FDR
SMALL_RIBOSOMAL_SUBUNIT			2.29	1.68E-05
CELL_PROJECTION_PART			-1.04	5.01E-01
DNA_PACKAGING_COMPLEX			-1.46	9.42E-02
LARGE_RIBOSOMAL_SUBUNIT			2.56	0.00E+00
ACTIN_CYTOSKELETON			-1.00	5.80E-01
SLIK_SAGA_LIKE_COMPLEX			0.78	9.85E-01
RSC_COMPLEX			-0.54	9.99E-01
COATED_VESICLE_MEMBRANE			0.77	9.89E-01
MEMBRANE_RAFT			-1.72	2.82E-02
CELLULAR_BUD_TIP			-0.95	6.52E-01
PROTEASOME_REGULATORY_PARTICLE			-1.44	1.03E-01
RIBONUCLEOPROTEIN_GRANULE			1.02	5.80E-01
TRANSPORT_VESICLE_MEMBRANE			0.84	9.36E-01
TRANSCRIPTION_FACTOR_TFIID_COMPLEX			-1.26	2.17E-01
REPLICATION_FORK_PROTECTION_COMPLEX			-1.07	4.47E-01
PROTEASOME_COMPLEX&STORAGE_GRANULE			-0.76	9.42E-01
CORTICAL_ENDOPLASMIC_RETICULUM			-1.16	3.37E-01
REPLISOME			-1.12	3.75E-01
NUCLEOLUS			2.28	1.59E-05
CYTOCHROME_COMPLEX			0.89	8.51E-01

D

Categorías GO_term: Función Molecular	Células pequeñas	Células grandes	NES	FDR
STRUCTURAL_CONSTITUENT_OF_RIBOSOME			-2.21	6.69E-04
EXOPEPTIDASE_ACTIVITY			-2.21	6.21E-04
PHOSPHATIDYLINOSITOL_BINDING			-2.20	1.02E-03
GTPASE_REGULATOR_ACTIVITY			-1.98	7.11E-03
LIPID_BINDING			-1.96	8.06E-03
CYTOSKELETAL_PROTEIN_BINDING			-1.91	1.12E-02
POSTTRANSLATIONAL_PROTEIN_TO_MEMBRANE			-1.89	1.30E-02
MOTOR_ACTIVITY			-1.88	1.33E-02
DNA_TRANSLOCASE_ACTIVITY			-1.88	1.34E-02
BASAL_TRANSCRIPTION_MACHINERY_BINDING			-1.84	1.57E-02
TRANSLATION_INITIATION_FACTOR_BINDING			-1.84	1.59E-02
GLUCOSYLTRANSFERASE_ACTIVITY			-1.83	1.66E-02
UBIQUITIN_BINDING			-1.81	1.90E-02
PHOSPHATASE_REGULATOR_ACTIVITY			-1.74	2.63E-02
STRUCTURAL_CONSTITUENT_OF_NUCLEAR_PORE			-1.63	4.66E-02
TRANSITION_METAL_ION_BINDING			1.62	4.37E-02
ANTIOXIDANT_ACTIVITY			1.66	2.93E-02
O_ACYLTRANSFERASE_ACTIVITY			1.68	2.43E-02
TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY			1.68	2.42E-02

E

Categorías GO_term: Función Molecular	Haploides	Tetraploides	NES	FDR
STRUCTURAL_CONSTITUENT_OF_RIBOSOME			1.42	2.00E-01
EXOPEPTIDASE_ACTIVITY			-0.83	8.64E-01
PHOSPHATIDYLINOSITOL_BINDING			1.51	1.56E-01
GTPASE_REGULATOR_ACTIVITY			-0.95	7.43E-01
LIPID_BINDING			1.26	3.05E-01
CYTOSKELETAL_PROTEIN_BINDING			1.43	1.94E-01
POSTTRANSLATIONAL_PROTEIN_TO_MEMBRANE			1.05	6.11E-01
MOTOR_ACTIVITY			1.45	1.88E-01
DNA_TRANSLOCASE_ACTIVITY			1.82	3.74E-02
BASAL_TRANSCRIPTION_MACHINERY_BINDING			1.35	2.33E-01
TRANSLATION_INITIATION_FACTOR_BINDING			1.45	1.90E-01
GLUCOSYLTRANSFERASE_ACTIVITY			-1.10	5.26E-01
UBIQUITIN_BINDING			1.23	3.34E-01
PHOSPHATASE_REGULATOR_ACTIVITY			1.08	5.54E-01
STRUCTURAL_CONSTITUENT_OF_NUCLEAR_PORE			0.96	7.74E-01
TRANSITION_METAL_ION_BINDING			1.03	6.41E-01
ANTIOXIDANT_ACTIVITY			1.07	5.74E-01
O_ACYLTRANSFERASE_ACTIVITY			-1.45	1.27E-01
TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY			0.88	8.80E-01

F

Categorías GO_term: Función Molecular	Crecimiento lento	Crecimiento rápido	NES	FDR
STRUCTURAL_CONSTITUENT_OF_RIBOSOME			3.14	0.00E+00
EXOPEPTIDASE_ACTIVITY			-0.64	9.98E-01
PHOSPHATIDYLINOSITOL_BINDING			-1.80	1.93E-02
GTPASE_REGULATOR_ACTIVITY			-0.97	6.19E-01
LIPID_BINDING			-1.94	5.80E-03
CYTOSKELETAL_PROTEIN_BINDING			-1.04	5.09E-01
POSTTRANSLATIONAL_PROTEIN_TO_MEMBRANE			1.17	3.25E-01
MOTOR_ACTIVITY			-1.51	7.25E-02
DNA_TRANSLOCASE_ACTIVITY			-1.45	9.68E-02
BASAL_TRANSCRIPTION_MACHINERY_BINDING			-1.46	9.46E-02
TRANSLATION_INITIATION_FACTOR_BINDING			0.95	7.21E-01
GLUCOSYLTRANSFERASE_ACTIVITY			-1.31	1.78E-01
UBIQUITIN_BINDING			-1.31	1.81E-01
PHOSPHATASE_REGULATOR_ACTIVITY			-2.07	1.80E-03
STRUCTURAL_CONSTITUENT_OF_NUCLEAR_PORE			1.42	9.98E-02
TRANSITION_METAL_ION_BINDING			0.99	6.38E-01
ANTIOXIDANT_ACTIVITY			-0.94	6.84E-01
O_ACYLTRANSFERASE_ACTIVITY			1.58	3.99E-02
TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY			1.02	5.82E-01

G

Categorías GO_term: Procesos Biológicos	Células pequeñas	Células grandes	NES	FDR
GLYCOLYTIC_PROCESS			-2.99	0.00E+00
ACTIN_CYTOSKELETON_ORGANIZATION			-2.48	0.00E+00
DISACCHARIDE_METABOLIC_PROCESS			-2.25	4.05E-04
CHROMATIN_REMODELING			-2.11	2.62E-03
ENDOCYTOSIS			-2.05	3.75E-03
GLUCAN_BIOSYNTHETIC_PROCESS			-2.05	4.03E-03
RETROGRADE_VESICLE_TRANSPORT_GOLGI_TO_ER			-2.02	5.30E-03
NUCLEOSOME&CHROMATIN_DISASSEMBLY			-1.99	6.73E-03
RAS_PROTEIN_SIGNAL_TRANSDUCTION			-1.95	8.69E-03
REGULATION_OF_PH			-1.94	9.03E-03
DNA_TEMPLATED_TRANSCRIPTION_ELONGATION			-1.94	9.43E-03
PROTEIN_REFOLDING			-1.93	9.68E-03
CYTOPLASMIC_TRANSLATION			-1.84	1.57E-02
REGULATION_OF_VACUOLE_ORGANIZATION			-1.80	1.96E-02
ENDOPLASMIC_RETICULUM_ORGANIZATION			-1.80	1.99E-02
ERGOSTEROL&PHYTOSTEROID_METABOLIC_PROCESS			-1.79	2.00E-02
RNA_EXPORT_FROM_NUCLEUS			-1.79	1.99E-02
CHROMOSOME_LOCALIZATION			-1.75	2.57E-02
EXOCYTOSIS			-1.75	2.59E-02
RIBOSOMAL_SMALL_SUBUNIT_ASSEMBLY			-1.72	2.92E-02
CELLULAR_AMINO_ACID_CATABOLIC_PROCESS			-1.65	4.23E-02
POLYSACCHARIDE_BIOSYNTHETIC_PROCESS			-1.64	4.49E-02
PYRIDINE_NUCLEOTIDE_METABOLIC_PROCESS			-1.64	4.50E-02
AMMONIUM_TRANSPORT			1.62	4.44E-02
SULFUR_COMPOUND_TRANSPORT			1.62	4.26E-02
ORGANIC_ACID_TRANSPORT			1.66	2.98E-02
CELLULAR_AMINO_ACID_BIOSYNTHETIC_PROCESS			1.66	3.04E-02
CELL_WALL_ASSEMBLY			1.68	2.41E-02
rRNA&ncRNA_5_END_PROCESSING			1.74	1.35E-02
MONOVALENT_INORGANIC_CATION_TRANSPORT			1.75	1.25E-02
CELLULAR_RESPIRATION			1.79	8.25E-03
VITAMIN_METABOLIC_PROCESS			1.85	3.58E-03
ATP_METABOLIC_PROCESS			2.36	0.00E+00

H

Categorías GO_term: Procesos Biológicos	Haploides	Tetraploides	NES	FDR
GLYCOLYTIC_PROCESS			-2.66	0.00E+00
ACTIN_CYTOSKELETON_ORGANIZATION			1.28	2.83E-01
DISACCHARIDE_METABOLIC_PROCESS			1.24	3.26E-01
CHROMATIN_REMODELING			1.87	2.81E-02
ENDOCYTOSIS			1.26	3.01E-01
GLUCAN_BIOSYNTHETIC_PROCESS			-1.21	4.22E-01
RETROGRADE_VESICLE_TRANSPORT_GOLGI_TO_ER			1.01	6.76E-01
NUCLEOSOME&CHROMATIN_DISASSEMBLY			1.48	1.65E-01
RAS_PROTEIN_SIGNAL_TRANSDUCTION			0.59	1.00E+00
REGULATION_OF_PH			1.43	1.92E-01
DNA_TEMPLATED_TRANSCRIPTION_ELONGATION			1.64	8.74E-02
PROTEIN_REFOLDING			1.28	2.85E-01
CYTOPLASMIC_TRANSLATION			1.10	5.21E-01
REGULATION_OF_VACUOLE_ORGANIZATION			1.08	5.55E-01
ENDOPLASMIC_RETICULUM_ORGANIZATION			0.89	8.70E-01
ERGOSTEROL&PHYTOSTEROID_METABOLIC_PROCESS			0.68	9.95E-01
RNA_EXPORT_FROM_NUCLEUS			1.26	3.01E-01
CHROMOSOME_LOCALIZATION			1.25	3.17E-01
EXOCYTOSIS			1.31	2.57E-01
RIBOSOMAL_SMALL_SUBUNIT_ASSEMBLY			1.04	6.32E-01
CELLULAR_AMINO_ACID_CATABOLIC_PROCESS			0.70	9.93E-01
POLYSACCHARIDE_BIOSYNTHETIC_PROCESS			0.72	9.86E-01
PYRIDINE_NUCLEOTIDE_METABOLIC_PROCESS			-0.78	8.93E-01
AMMONIUM_TRANSPORT			-1.57	7.19E-02
SULFUR_COMPOUND_TRANSPORT			0.45	1.00E+00
ORGANIC_ACID_TRANSPORT			0.83	9.34E-01
CELLULAR_AMINO_ACID_BIOSYNTHETIC_PROCESS			1.63	9.98E-02
CELL_WALL_ASSEMBLY			0.90	8.55E-01
rRNA&ncRNA_5_END_PROCESSING			1.17	4.23E-01
MONOVALENT_INORGANIC_CATION_TRANSPORT			1.26	3.01E-01
CELLULAR_RESPIRATION			1.13	4.80E-01
VITAMIN_METABOLIC_PROCESS			0.99	7.19E-01
ATP_METABOLIC_PROCESS			1.62	1.09E-01

I

Categorías GO_term: Procesos Biológicos	Crecimiento lento	Crecimiento rápido	NES	FDR
GLYCOLYTIC_PROCESS			-0.87	7.89E-01
ACTIN_CYTOSKELETON_ORGANIZATION			-1.09	4.28E-01
DISACCHARIDE_METABOLIC_PROCESS			-1.85	1.43E-02
CHROMATIN_REMODELING			-1.62	4.38E-02
ENDOCYTOSIS			-1.71	2.88E-02
GLUCAN_BIOSYNTHETIC_PROCESS			-1.77	2.26E-02
RETROGRADE_VESICLE_TRANSPORT_GOLGI_TO_ER			0.91	8.21E-01
NUCLEOSOME&CHROMATIN_DISASSEMBLY			-0.56	9.99E-01
RAS_PROTEIN_SIGNAL_TRANSDUCTION			-1.80	1.90E-02
REGULATION_OF_PH			-1.07	4.56E-01
DNA_TEMPLATED_TRANSCRIPTION_ELONGATION			-0.71	9.64E-01
PROTEIN_REFOLDING			-1.51	7.19E-02
CYTOPLASMIC_TRANSLATION			2.40	0.00E+00
REGULATION_OF_VACUOLE_ORGANIZATION			-1.40	1.21E-01
ENDOPLASMIC_RETICULUM_ORGANIZATION			-0.61	9.99E-01
ERGOSTEROL&PHYTOSTEROID_METABOLIC_PROCESS			0.69	1.00E+00
RNA_EXPORT_FROM_NUCLEUS			1.42	1.00E-01
CHROMOSOME_LOCALIZATION			-0.86	8.02E-01
EXOCYTOSIS			-1.71	2.92E-02
RIBOSOMAL_SMALL_SUBUNIT_ASSEMBLY			1.96	2.13E-03
CELLULAR_AMINO_ACID_CATABOLIC_PROCESS			0.82	9.54E-01
POLYSACCHARIDE_BIOSYNTHETIC_PROCESS			-1.50	7.45E-02
PYRIDINE_NUCLEOTIDE_METABOLIC_PROCESS			0.96	6.89E-01
AMMONIUM_TRANSPORT			-0.74	9.47E-01
SULFUR_COMPOUND_TRANSPORT			1.33	1.56E-01
ORGANIC_ACID_TRANSPORT			0.85	9.17E-01
CELLULAR_AMINO_ACID_BIOSYNTHETIC_PROCESS			2.34	0.00E+00
CELL_WALL_ASSEMBLY			-1.46	9.43E-02
rRNA&ncRNA_5_END_PROCESSING			1.96	2.09E-03
MONOVALENT_INORGANIC_CATION_TRANSPORT			-0.95	6.52E-01
CELLULAR_RESPIRATION			1.08	4.72E-01
VITAMIN_METABOLIC_PROCESS			1.11	4.23E-01
ATP_METABOLIC_PROCESS			0.81	9.61E-01

Figura 28: Determinadas categorías funcionales muestran una expresión génica alterada en células grandes frente a pequeñas.

Representación mediante códigos de barras del enriquecimiento en genes pertenecientes a las diferentes categorías de los GO_term, con una expresión diferencial para las muestras por tamaño (A, D y G, células grandes frente a pequeñas), por ploidía (B, E y H, tetraploides frente a haploides) y por velocidad de crecimiento (C, F e I, células con crecimiento rápido frente a uno lento).

En naranja se indican los genes con una mayor expresión en células grandes, tetraploides o con una velocidad de crecimiento rápida.

En azul se indican los genes con una mayor expresión en células pequeñas, haploides o con una velocidad de crecimiento lenta.

En gris se indican los genes con una expresión diferencial no significativa (FDR<0.05)

NES (*normalized enrichment score*)

(A, B y C) Categorías GO_term de componente celular (1).

(D, E y F) Categorías GO_term de función molecular (2).

(G, H e I) Categorías GO_term de proceso biológico (3).

Con respecto al valor de NES, cuanto más negativo, más desplazados estarán los genes de esa categoría hacia la izquierda. Lo podemos interpretar como que, las categorías con un NES más negativo indican un mayor número de genes pertenecientes a esa categoría con un enriquecimiento en las células pequeñas frente al total de genes, es decir, mayor número de genes que muestran una mayor expresión en las células pequeñas frente a las grandes. Por el contrario, cuanto más positivo sea el NES para una categoría, mayor será su enriquecimiento en genes con una mayor expresión en las células grandes.

En la **Figura 28** se muestran las tres tablas del análisis del enriquecimiento para la categoría de componentes celulares de los tres experimentos (**Figura 28A,B y C**). A continuación, se muestran las tres tablas para la categoría de función molecular (**Figura 28D,E y F**), y por último las tres para procesos biológicos (**Figura 28G,H e I**), mostrando siempre en primer lugar el análisis por tamaño, luego el de la ploidía y finalmente el de la velocidad de crecimiento.

Como se puede observar en la **Figura 28**, las categorías más enriquecidas en genes con una mayor expresión en las células pequeñas, es decir, enriquecidas en genes con menor expresión en las células grandes con respecto a las pequeñas, fueron las relacionadas con las proteínas ribosomales, tanto para la subunidad pequeña como para la grande, así como las del crecimiento polar de la yema, el citoesqueleto de actina y el transporte de vesículas de membrana, entre otras. Por el contrario, el nucleolo estaba enriquecido en genes con una mayor expresión en las células grandes.

Un vistazo general de estos análisis nos llevó a fijarnos inexcusablemente en dos grandes grupos: los ribosomas y el nucleolo. Pero es cierto que se pueden apreciar multitud de genes y categorías o mecanismos con su expresión génica afectada en las células grandes con respecto a las células pequeñas.

3.6. La velocidad específica de crecimiento en S-G2 disminuye debido a la insuficiencia génica relacionada con diversos mecanismos moleculares

Tras el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para las muestras de RNAseq, quisimos escoger ciertos candidatos para determinar la relevancia funcional de su posible insuficiencia génica. Para ello, hicimos un muestreo seleccionando unos cuantos genes de cada categoría con diferencias significativas observadas en la **Figura 28**.

Existen varios fenotipos en que puede manifestarse la haploinsuficiencia (normalmente realizados en diploides): por volumen, termosensibles, de crecimiento,... Nosotros quisimos estudiar este último fenotipo, el de la velocidad de crecimiento. Ello se llevó a cabo en células tetraploides wt, a las que se les deleccionó tres de las cuatro copias génicas de uno de los genes a estudiar. Así, lo que nosotros realizamos fue un estudio de insuficiencia génica, y ver la velocidad de crecimiento en células con el mismo número de copias génicas que un haploide (para ese candidato a estudiar), mientras tiene un volumen correspondiente a células tetraploides. Es decir, estaríamos simulando las células BF305 (haploides) cuando alcanzaban tamaños tan grandes como los tetraploides, y veíamos su velocidad β disminuida.

La realización de una división celular completa podemos decir que tiene dos etapas: el crecimiento en G1 (α) y el crecimiento en S/G2/M (β). Nosotros estudiamos, como anteriormente, si existía una insuficiencia con respecto al crecimiento mediante el estudio de la velocidad específica de crecimiento en S-G2 (β/Vb), pues al ser ésta mayor que α , pensamos que cualquier defecto mostraría un mayor fenotipo. Pero el principal motivo fue porque estábamos estudiando la involucración de estos genes y su importancia en el crecimiento polarizado en las células con volúmenes de gemación grandes, pues es cuando vimos que las células empezaban a tener problemas de crecimiento.

Para seleccionar a los candidatos tuvimos en cuenta varios requisitos. El más importante fue que mostraran una expresión génica en el análisis de RNAseq deficitaria en las células grandes frente a las pequeñas, y que dicho *score* fuera significativo según el *p-value*. Otro filtro que pusimos fue que buscábamos genes con una misma expresión relativa entre las células tetraploides y las haploides (Wu et al., 2010). También quisimos que fueran genes esenciales, inviabilizables, para poder apreciar mejor el fenotipo tras la insuficiencia génica de tan solo uno de los genes seleccionados. Y, por último, que se hubiera visto en ellos un crecimiento afectado en estudios de haploinsuficiencia en diploides (Novo et al., 2013; Pir et al., 2012).

Así, determinamos la velocidad de crecimiento en S-G2 (β/Vb) para todos los candidatos seleccionados. Los datos de cada uno de los tetraploides mutantes fueron relativizados frente al tetraploide wt. *PSA1* no mostró haploinsuficiencia según la bibliografía y nos sirvió como control con relación al wt.

En la **Figura 29** se puede apreciar como la mayoría de los mutantes analizados presentaron una disminución significativa de la velocidad de crecimiento en S-G2. *PSA1*, el gen seleccionado como control según la bibliografía había sido caracterizado por mostrar una

mayor velocidad de crecimiento en los diploides con una sola copia génica. Lo mismo observamos en nuestros experimentos, pues éste mostró un ligero aumento significativo en β con respecto al wt. Aunque para este candidato observamos una menor expresión proteica a volúmenes grandes, podría ser que las células tuvieran suficiente con esos niveles de expresión.

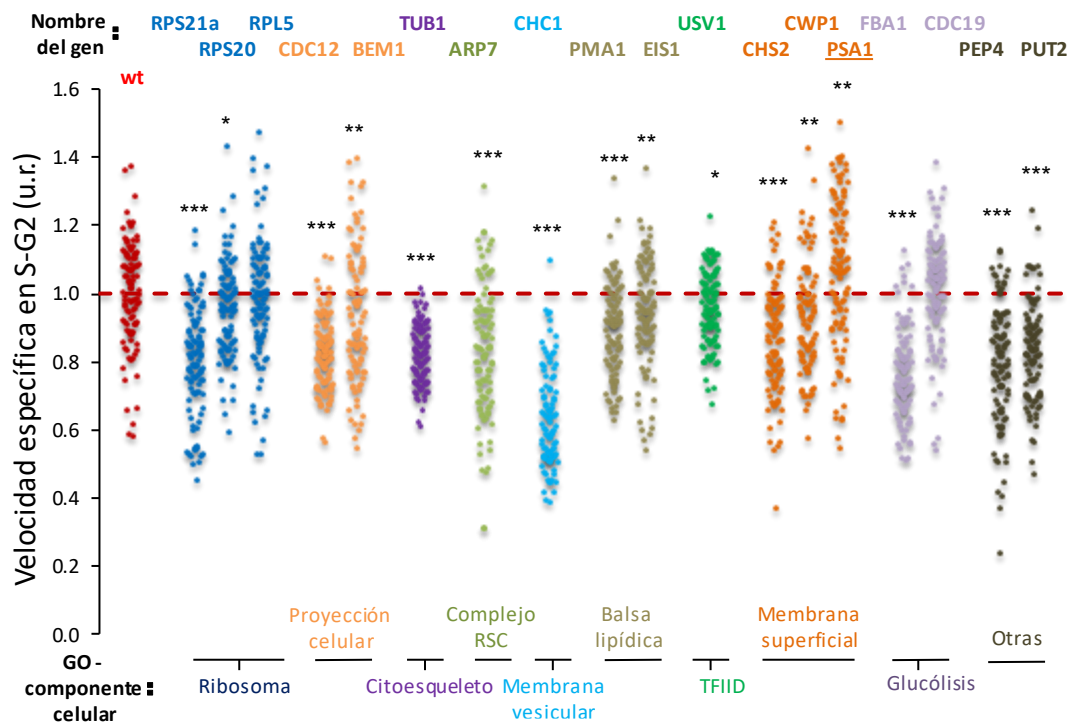


Figura 29: La velocidad de crecimiento en S-G2 disminuye debido a la insuficiencia génica relacionada con diversos mecanismos moleculares.

Velocidad específica de crecimiento de la yema en S-G2 relativa al wt, para una variedad de candidatos con insuficiencia génica. Los experimentos fueron llevados a cabo en tetraploides a los que se les delecionó tres de sus cuatro copias génicas para el gen candidato.

T-test (p-value): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

De nuevo, los genes de las proteínas ribosomales fueron unos de los que mostraron insuficiencia génica relacionada con la velocidad de crecimiento. De estos genes hay unos 200, y el número de copias es muy alto. Son unas de las proteínas más abundantes e importantes en la célula, por lo que el gasto energético que conllevan es enorme. No sería de extrañar que las células regulasen de alguna manera su expresión a través de algún mecanismo relacionado con el volumen celular. Aun así, no solamente se observaron problemas en la velocidad de crecimiento relacionada con la insuficiencia génica de las proteínas ribosomales. Al igual que con la expresión diferencial en las células grandes, existían multitud de genes y mecanismos afectados a volúmenes grandes. Ya fuese por una regulación de la expresión directa de éstos con el volumen celular, o indirectamente, porque fuese la expresión de las proteínas

ribosomales a volúmenes celulares grandes la que estaba provocando que la expresión de estos otros genes se viera afectada.

En resumen, nuestros resultados indican que la menor eficiencia en crecimiento polarizado de las células con tamaño superior al crítico sería el resultado de la insuficiente expresión en genes clave de distintos subprocesos celulares que concurren en el crecimiento polarizado de la yema en el inicio del ciclo celular de la levadura de gemación.

V. Discusión

En este estudio hemos comprobado que la velocidad de crecimiento relativa a un volumen dado, es decir, la velocidad específica de crecimiento en S-G2 depende fuertemente del volumen de gemación, disminuyendo considerablemente a volúmenes celulares grandes. Esto lo vimos para el caso del crecimiento apical o polar de la yema en S-G2, no sucediendo lo mismo durante el crecimiento isotrópico de las levaduras durante G1. Es decir, la velocidad específica de crecimiento durante G1 es independiente del tamaño celular. Ello confiere una clara desventaja de crecimiento a las células con tamaño mayor o menor que el wt a lo largo de un número elevado de generaciones.

Vimos que esta dependencia de la velocidad de crecimiento con el volumen solamente ocurría en el caso de las células con un crecimiento normal. En el caso de células que tenían ya un crecimiento afectado, estos mecanismos de regulación de la velocidad de crecimiento de la yema con el volumen de gemación no eran aditivos, es decir, la velocidad de crecimiento de estas células no se veía ya afectada a tamaños superiores.

También observamos que dicha limitación en la velocidad de crecimiento de la yema con el volumen era debido a una insuficiencia génica o a una expresión insuficiente de algunos genes. En células diploides y tetraploides, en que el volumen de gemación viene acompañado de un aumento de la dosis génica, la velocidad de crecimiento en S-G2 no se veía afectada a volúmenes de gemación en que las células haploides sí muestran deficiencias.

El transporte de vesículas hacia la yema es uno de los factores o mecanismos de insuficiencia génica que podrían afectar al crecimiento polar durante S-G2. Aunque observamos que la velocidad de transporte de Myo2 y de Sec31 estaba afectada a volúmenes grandes, la concentración de Myo2 no estaba afectada, y tampoco vimos una carencia en los filamentos de actina. Más bien sería debido a las vesículas o al cargo en sí, pues como vimos, varias proteínas de membrana necesarias para el crecimiento apical tenían un nivel de expresión proteica disminuido a volúmenes de gemación grandes.

Mediante un análisis en la expresión génica por RNAseq de las células grandes, observamos que, además de existir una expresión deficitaria en estas células frente a las células pequeñas en los genes relacionados con el crecimiento polar y el transporte de vesículas de membrana, también lo estaban los genes de las proteínas ribosomales (PR). Así, uno de los motivos por los que el cargo no llegaba a la velocidad que correspondería a volúmenes celulares grandes estaría relacionado con una deficiencia en su síntesis.

1. Velocidad de crecimiento afectada por el tamaño crítico

En un estudio donde realizaron un screening con el conjunto completo de todas las deleciones génicas en *S. cerevisiae*, obtuvieron una amplia distribución de tamaños celulares y determinaron que existían multitud de mecanismos que acoplaban el crecimiento celular con la división en levaduras (Jorgensen et al., 2002). Vieron que las funciones de los genes que afectaban al volumen celular pertenecían a categorías muy diversas y pensaron que la

desregulación de cualquier proceso importante para el progreso del ciclo celular, pero sin afectar al crecimiento, afectaría a la entrada en START y por ello debería llevar a un incremento en el tamaño crítico o tamaño celular.

Pero nosotros vimos lo contrario. Observamos que, en células con tamaños celulares anormalmente grandes, ciertos genes no se expresarían en las proporciones acordes a sus volúmenes celulares, por lo que existiría una desregulación en los mecanismos que coordinan crecimiento y progreso en el ciclo celular. Pero esa desregulación, y todos los problemas que conllevan, solamente afectaría una vez las células han determinado el tamaño crítico en START, pues la velocidad específica o relativa a su volumen no estaba afectada por el tamaño celular durante G1. En cambio, sí que existía una dependencia y una fuerte disminución de la velocidad específica de crecimiento a volúmenes de gemación grandes durante el crecimiento apical de la yema en las fases S-G2.

Esas diferencias observadas entre la velocidad específica o relativa al volumen en G1 frente a las fases de S-G2 a volúmenes grandes podrían ser las responsables de la disminución en el *fitness* de las células pequeñas, pero sobre todo de las grandes, frente al wt. Vimos que en una competición celular poniendo en el mismo medio de cultivo ambos tipos de células a crecer, la población de células grandes disminuía con respecto a las células wt, pero lo hacían poco a poco. Los efectos los apreciamos con el paso del tiempo, tras varias generaciones. Ello podría ser debido a que la mayor parte del ciclo celular se desarrolla con un crecimiento isotrópico, principalmente durante G1, mientras que el crecimiento polar de la yema durante las fases S-G2 solamente tiene lugar por unos 30 minutos (Farkas et al., 1974; Lew and Reed, 1993). Y como vimos, las deficiencias en la velocidad de crecimiento con el volumen se encontraban en el crecimiento polar. Seguramente, esas diferencias observadas en el crecimiento entre las células grandes y las células wt serían pequeñas en un solo ciclo celular, pero permitiría a las células wt un menor tiempo de generación o división celular, con lo que su población aumentaría más rápidamente que la de los mutantes dentro del mismo cultivo. Dichas diferencias se irían acumulando ciclo tras ciclo, y tras varias generaciones veríamos que la población de células wt, es decir, la población de células con el rango de volúmenes correspondiente a las velocidades específicas óptimas terminaría predominando frente a las células más grandes o pequeñas.

Así, las levaduras de gemación habrían establecido un rango de volúmenes con los que, una vez ejecutado START, continuar creciendo en el ciclo celular a una velocidad óptima. Ello podría tener una relevancia evolutiva importante, pues como hemos dicho, una población terminaría predominando sobre las demás tras largos períodos de tiempo. Por ello, las células de levadura de gemación con volúmenes optimizados para el crecimiento tendrían una ventaja evolutiva frente a las células con volúmenes superiores o inferiores.

Al igual que en las bacterias, donde vieron que tanto las velocidades de síntesis en volumen como en superficie escalaban con el volumen (Harris and Theriot, 2016), en las levaduras de gemación comprobamos que durante el crecimiento isotrópico en G1 la velocidad de crecimiento en volumen aumentaba proporcionalmente a su tamaño,

permaneciendo la velocidad específica constante o independiente del volumen celular. Pero como se ha mencionado anteriormente, no ocurre lo mismo para el crecimiento del volumen de la yema durante las fases S-G2, decreciendo su velocidad específica a volúmenes grandes. No sabemos exactamente a qué podría ser debido, pero lo que sí sabemos es que la velocidad de crecimiento en S-G2 (β) es mayor que en G1 (α). Además, como mostramos en la simulación de la **Figura 30**, la relación área superficial frente al volumen (SA/V) es mínima en la gemación, y la velocidad de crecimiento o síntesis del área superficial alcanza su pico máximo justamente después de la gemación. Es decir, en el momento de la gemación existe una fuerte demanda de componentes y proteínas de membrana y de la pared celular necesarios para el óptimo crecimiento apical de la yema durante el crecimiento polar de las levaduras de gemación.

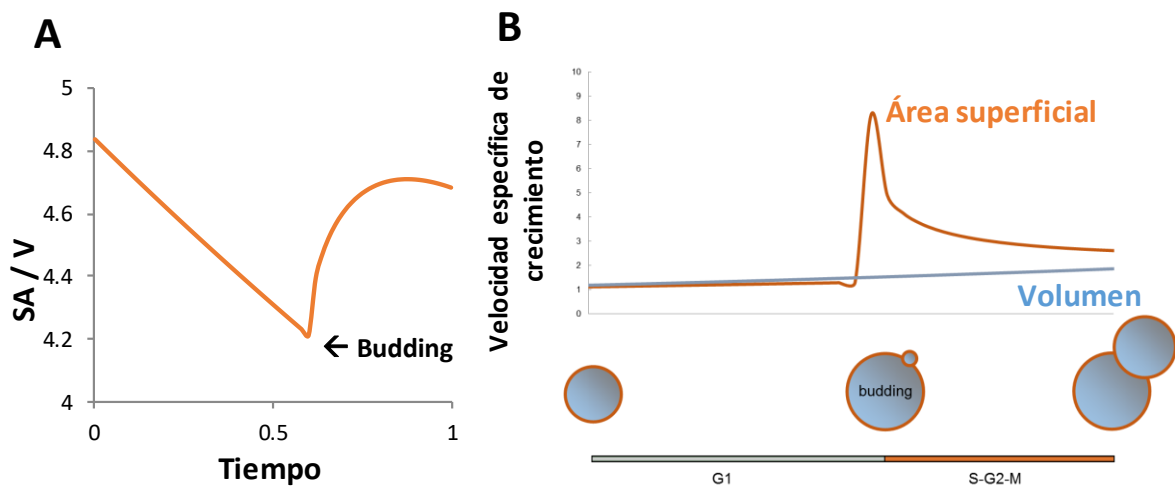


Figura 30: La velocidad de crecimiento en superficie muestra un máximo al inicio de la gemación.
(A) Simulación de la relación Área superficial (SA) / Volumen (V) frente al tiempo.
(B) Simulación de la relación Velocidad de crecimiento/Volumen frente al tiempo, tanto para el área superficial como para el volumen en levaduras de gemación.

Podría ser que las células determinasen el volumen de gemación dentro de un rango de tamaños celulares con los cuales se pudiera llevar a cabo un crecimiento o síntesis en superficie eficientemente. Y que cuando dichos volúmenes de gemación aumentan demasiado, se produjese cierto tipo de disminución en la expresión o concentración de ciertas proteínas, es decir, que hubiera una insuficiencia génica en ciertos genes relacionados y necesarios para el crecimiento de la yema, pues dichas células habrían aumentado su volumen, pero no el número de copias de los genes implicados (DNA). Con lo que cabría esperar que a esos volúmenes ya no se sintetizaría la membrana y/o el volumen de la yema de la manera más óptima posible, observando como resultado una menor velocidad específica de crecimiento de la yema en S-G2 a volúmenes grandes.

2. El transporte hacia la yema está afectado por el tamaño crítico

Para un crecimiento celular óptimo es imprescindible una adecuada velocidad de síntesis de la membrana superficial. Para que esto ocurra, los diferentes componentes que forman la pared celular y la membrana plasmática tienen que ser transportados a la velocidad correspondiente al crecimiento en ese instante, es decir, acorde al tamaño celular. Dicho transporte activo se lleva a cabo a través de las vesículas de secreción.

La producción de vesículas en G1 parece no ser limitante con el volumen, pues como vimos, las células BF305 crecen exponencial hasta tamaños muy grandes. Pero en cambio, sí que lo podría ser durante la gemación, pues como acabamos de observar en la **Figura 30**, dSA/dt aumenta muchísimo durante el período subsiguiente al inicio de la gemación. Por lo que, a volúmenes de gemación grandes, si no se sintetizan y transportan la cantidad necesaria de componentes para el crecimiento de la yema, ello podría disminuir la velocidad de ese crecimiento a volúmenes celulares grandes.

Efectivamente, nosotros comprobamos que a volúmenes de gemación grandes el transporte activo de vesículas de secreción desde la célula madre hasta la yema estaba afectado y no llegaban a la velocidad que les correspondería a esos volúmenes. Formando parte del transporte de vesículas existen multitud de componentes involucrados. Pero no vimos que fuera la maquinaria de transporte la responsable de la disminución en su velocidad, pues al estudiar el transportador de las vesículas, Myo2, éste se producía sin ningún tipo de problemas incluso a volúmenes grandes. Miramos también los cables de actina, y tampoco vimos que hubiera defectos a volúmenes grandes, pues el haploide y el diploide prácticamente mostraron el mismo número de filamentos de actina, así como las células grandes, no siendo por ello los limitantes ni los causantes de una disminución en el transporte.

El problema podría ser de las vesículas, de sus componentes (carga). Si el problema fuera el cargo, lo más probable es que sea su síntesis, la producción de éste, y ello explicaría por qué el transporte no llega suficientemente rápido a la yema a volúmenes grandes. Para demostrarlo, hicimos un muestreo de las proteínas más importantes para el crecimiento de la yema tras la gemación, relacionadas con el crecimiento de membrana y que estaban reguladas por ciclo, con su máximo de expresión en la transición G1/S. Efectivamente, observamos como la expresión de muchas de ellas estaba muy disminuida a volúmenes de gemación grandes. Así, podría ser que estos materiales no llegasen a la yema en las cantidades adecuadas para su correcto crecimiento, y por ello mostrar una disminución en la velocidad de transporte, lo que provocaría la disminución en la velocidad de crecimiento en S-G2.

Vimos que la velocidad de transporte de Myo2 o de las vesículas estaba disminuida a volúmenes grandes durante el crecimiento polar de S-G2, así como la expresión del cargo o de ciertas proteínas de membrana. Podría suceder que hasta que las vesículas no estuvieran totalmente formadas y cargadas de los componentes a transportar, Myo2 no se uniría a ellas y no se llevaría a cabo el transporte de las vesículas de secreción hasta la yema (Donovan and Bretscher, 2012, 2015; Pruyne et al., 1998) , pues este tipo de transporte es un transporte

activo, el cual consume mucha energía. Y las células podrían tener mecanismos para ahorrar dicha energía y que las vesículas no fuesen ensambladas hasta que no hubiera la cantidad adecuada de componentes a transportar hasta la yema.

Al igual que con Myo2, también vimos una menor velocidad de secreción de Sec31 a volúmenes grandes, aunque la interpretación de ello no es tan obvia. De hecho, Sec31 marca los “sitios de salida” del retículo endoplásmico (RE) donde se forman los intermediarios de transporte entre éste y el aparato de Golgi. COPII necesariamente se desensambla antes de que las vesículas de secreción se fusionen con el Golgi en su tránsito hacia la membrana plasmática (Blume et al., 2009; Donovan and Bretscher, 2015; Tagawa et al., 2005). En términos estrictos, desconocemos si lo que estábamos midiendo con los experimentos de FRAP con Sec31-GFP era la velocidad a la que se transfiere el RE a la yema, o la velocidad a que se transportan vesículas con Sec31-GFP desde diversas zonas del RE de la célula madre a la yema mediante cables de actina y Myo2.

En cualquier caso, lo que estábamos observando era un transporte más lento de Sec31 hacia la yema a volúmenes celulares grandes. Ello también sería de importancia para el crecimiento apical de la yema, y podría ser una de las causas de la menor velocidad de crecimiento de ésta a volúmenes grandes, pues muchos de los lípidos de la membrana plasmática se sintetizan en el RE y son transferidos directamente a las membranas, no necesariamente a través de la ruta secretora (Hurley, 2010). E incluso, la importancia de Sec31 para el crecimiento apical de la yema podría estar en que esta proteína fuese necesaria para el transporte retrógrado o el reciclado de los componentes que van desde la yema hacia la célula madre.

3. Expresión diferencial entre células pequeñas y células grandes

3.1. Las histonas no aumentan su expresión con el volumen celular

Al analizar la expresión de los genes regulados por ciclo en nuestras muestras de células pequeñas y grandes durante la gemación, y compararla a la de células asincrónicas, vimos un punto de inflexión justamente antes de la transición G1/S. Pero lo que nos llamó la atención fue la expresión de las histonas en las muestras de células grandes, las cuales estaban empobrecidas en comparación con las células pequeñas.

La expresión de las histonas está muy regulada por ploidía (Stein et al., 1992). Para la mayoría de los genes su expresión aumenta con la masa, aunque como vimos no siempre de manera proporcional a ésta. Pero en el caso de las histonas ello no sucede. No se induce una mayor expresión de las histonas en estas células grandes, aunque deberían tanto por tamaño como por estar entrando en G1/S. Pensemos que la expresión es a nivel basal y luego hay un pico en G1/S. Si en las células grandes ese nivel basal ya es muy alto, porque la expresión aumenta con la masa, dichas células estarían indicando que ya no necesitan más histonas

mediante un mecanismo de inhibición, pues ya tienen suficientes de acuerdo con su ploidía, a su cantidad de DNA.

3.2. Categorías de genes cuya expresión no escala con el tamaño

Además de lo mencionado anteriormente para las histonas, cuando hicimos el análisis de enriquecimiento de genes con una expresión diferencial entre las células grandes y las pequeñas, de nuevo volvimos a corroborar que las histonas (dentro de la categoría denominada “complejo empaquetador del DNA”) presentaron un enriquecimiento en las células pequeñas, es decir, la expresión de las histonas en las células grandes estaba disminuida con respecto a las células pequeñas. No se producen más histonas con el volumen celular. La expresión de las histonas aumenta acorde con la ploidía.

Como dijimos anteriormente, las categorías con un NES más positivo son las enriquecidas en genes más expresados en las células grandes. Así, estos genes se expresarán más cuanto mayor es la masa celular, y lo hacen proporcionalmente al tamaño.

Vamos a continuar con las demás observaciones de las gráficas de los enriquecimientos, comparando los resultados de nuestro experimento por tamaño, con el de ploidía y el de la velocidad de crecimiento. Para el caso de la expresión diferencial por tamaño, si miramos las categorías dentro del GO_term para el componente celular, las categorías con un enriquecimiento en genes más expresados en las células pequeñas fueron las relativas a los ribosomas, tanto pertenecientes a las subunidades grandes como a las pequeñas, así como las del crecimiento apical, las del citoesqueleto de actina y las del transporte y recubrimiento de las vesículas de membrana. Por otro lado, las categorías enriquecidas en genes más expresados en las células grandes fueron las del complejo del citocromo, pero, sobre todo, la relacionada con el nucleolo.

Ninguna de las categorías mencionadas mostró una mayor expresión por ploidía. Pero en cambio, en el experimento de la velocidad de crecimiento sí que se vieron algunos resultados llamativos. Las balsas lipídicas fue la única categoría significativa con un enriquecimiento en las células con un crecimiento más lento, mientras que en la expresión diferencial por tamaño estuvieron enriquecidas en las células pequeñas. Y por el otro lado, las categorías enriquecidas en genes con una mayor expresión en las células con un crecimiento rápido fueron las del nucleolo y las dos de las subunidades ribosomales tanto las grandes como las pequeñas. Es decir, para el caso del nucleolo, dicha categoría estaba enriquecida en genes con una mayor expresión en las células con un crecimiento más rápido, mientras que también lo estaba en las células grandes (cuando vimos que éstas tenían una menor velocidad que las células pequeñas, al menos en S-G2). Por lo que podríamos esperar que algo importante ocurre en el nucleolo de las células grandes. Y para el caso de los genes de las proteínas ribosomales sí que coincidía, pues estaban enriquecidas tanto en las células pequeñas como en las células con una velocidad de crecimiento más rápida.

A continuación, y siguiendo con las muestras de nuestro experimento, analizamos las categorías del GO_term relacionadas con la función molecular. De ello pudimos determinar que las categorías con genes más enriquecidos en las células pequeñas fueron de nuevo la de los constituyentes estructurales de los ribosomas, la de actividad exopeptidasa (porque tienen que ver con degradar la pared para crecer), la de unión de lípidos, unión a proteínas del citoesqueleto, actividad GTPasa, y de unión a fosfatidilinositol (relacionados con la regulación de la exocitosis y endocitosis). Mientras que la principal categoría con un enriquecimiento en genes más expresado en las células grandes fue la de actividad transportadora de membrana, con lo que se puede pensar que en estas células no habría problemas en la maquinaria de transporte en sí.

Para el análisis por ploidía, prácticamente no hubo ninguna categoría con una expresión diferencial significativa. Para el análisis por la velocidad de crecimiento, de nuevo vimos la categoría relacionada con los ribosomas enriquecida en las células que crecen más rápido. Coincidiendo como anteriormente con el resultado del análisis por tamaño, donde dicha categoría estaba enriquecida en las células pequeñas. En cambio, las categorías de unión a fosfatidilinositol y a lípidos estuvieron enriquecidas tanto en las células de crecimiento lento como en las células pequeñas, algo en principio contradictorio.

Para finalizar con el análisis de los enriquecimientos en la expresión génica de las diferentes categorías, nos fijamos en las relacionadas con los procesos biológicos. Empezando por las enriquecidas en genes más expresados en las células pequeñas, observamos que existían multitud de categorías, de las que pudimos destacar las siguientes: la relacionada con los procesos glucolíticos, la organización del citoesqueleto de actina, la endocitosis, la exocitosis y la traducción citoplasmática, entre otras. Todas ellas estaban relacionadas con la síntesis de componentes de membrana y con el transporte de vesículas. Por el otro lado, las categorías más enriquecidas en genes más expresados en las células grandes fueron las de los procesos metabólicos del ATP, la respiración celular, la síntesis de aminoácidos y el transporte de iones y metabolitos. Es decir, las categorías relacionadas con el metabolismo, el transporte y la respiración (la cadena transportadora de electrones). Estos genes son necesarios para un crecimiento óptimo, al menos en G1. Por ello, las células no tienen ningún impedimento en expresarlos acorde a su masa, y mientras las células sigan aumentando su tamaño, éstos estarán más expresados, por lo que el crecimiento en G1 será eficiente incluso en células muy grandes, como vimos en las gráficas de la velocidad de crecimiento de la BF305 en G1, en glucosa, en donde crecían exponencialmente sin ningún tipo de limitación.

Según el análisis de la velocidad de crecimiento, las categorías enriquecidas en las células con un mayor crecimiento son la de traducción citoplasmática y de biosíntesis de aminoácidos. La primera concuerda con lo visto con el análisis del tamaño, donde ésta se encontraba enriquecida en células pequeñas. Una vez más, vemos que existe una mayor expresión y actividad ribosomal en las células con un crecimiento rápido, así como en las células pequeñas. Pero si miramos la biosíntesis de aminoácidos para las células grandes, éstas se encuentran enriquecidas en dichos genes, por lo que no cabe esperar que el problema de la menor velocidad de crecimiento de las células grandes esté en dicha vía. Por otra parte, las

categorías enriquecidas en las células con una velocidad de crecimiento menor son las relacionadas con los procesos de endocitosis y exocitosis, al contrario de lo que vimos en el análisis por tamaño, donde éstas estaban enriquecidas en las células pequeñas.

3.3. Diversas insuficiencias génicas provocan una caída de la velocidad específica de la yema a volúmenes grandes

Como resumen de lo anteriormente visto en los análisis de enriquecimiento, en las células grandes existían multitud de genes con una menor expresión relativa a las células pequeñas, los cuales estaban relacionados con categorías o mecanismos diferentes. Para analizar su relevancia funcional llevamos a cabo experimentos de insuficiencia génica en tetraploides, en que estudiamos los efectos de la delección de tres de las cuatro copias de genes paradigmáticos de dichas categorías génicas, y estudiar el fenotipo de la velocidad de crecimiento en S-G2 que mostraban dichos mutantes.

Según pudimos observar, multitud de genes presentaron una insuficiencia génica mostrando el mismo fenotipo, una velocidad específica de crecimiento disminuida en S-G2. Y no solamente los genes de las proteínas ribosomales, sino que existían multitud de genes y mecanismos afectados a volúmenes grandes. Seguramente, la suma o adición de todas estas insuficiencias génicas a la vez serían las responsables de la caída de la velocidad específica de crecimiento en las células grandes. O bien esas insuficiencias génicas eran debidas a una menor expresión de las proteínas ribosomales y por ello una menor síntesis proteica en general en las células grandes, o por el contrario estaría afectada la expresión de todos esos genes por diversos motivos. Además, podría suceder que para estos genes que vimos una insuficiencia génica a volúmenes grandes, sus mRNA tuviesen una menor afinidad por los ribosomas. Y cuando las células se hicieran grandes y la expresión de las proteínas ribosomales disminuyese, cabría esperar que dichos genes fuesen los más afectados, a los que les disminuiría antes su expresión.

4. Posibles mecanismos afectados en las células grandes

4.1. Interacciones genéticas en las categorías enriquecidas en genes con una menor expresión en las células grandes

Primero vimos que existían multitud de genes con una expresión génica disminuida en las células grandes con respecto a las pequeñas. Más tarde observamos que ellos pertenecían a unas cuantas categorías o mecanismos relacionados con el crecimiento en general y de la yema en particular. Ahora queríamos estudiar si existían relaciones entre dichos genes, y reforzar la hipótesis de que la suma de las diferentes insuficiencias génicas sería la responsable

del fenotipo global observado de una menor velocidad específica de la yema para volúmenes de gemación grandes.

Así, fuimos a mapear los genes de nuestro análisis de RNAseq en un trabajo sobre redes de interacciones génicas (Costanzo et al., 2016). Esos experimentos fueron realizados cruzando parejas de mutantes simples, y observando si en el *fitness* (velocidad de crecimiento de colonia) de esa nueva cepa se veía un efecto sumatorio, multiplicativo o supresor en esos dobles mutantes comparado con los mutantes simples.

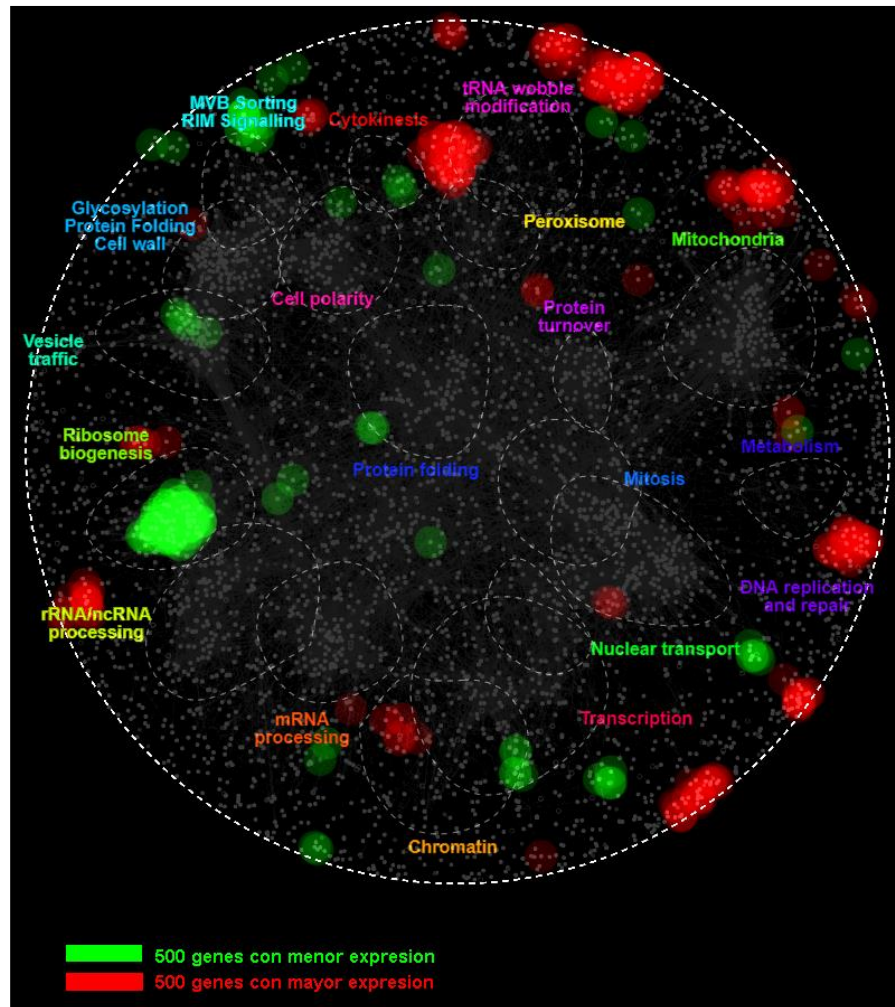


Figura 31: Mapa de interacciones genéticas.

Red de interacciones genéticas para los 500 genes más expresados (en rojo) y menos expresados (en verde) en las células grandes frente a las pequeñas. Adaptado del trabajo de (Costanzo et al., 2016). Cada punto gris representa a un gen de levadura. La distancia entre dos puntos es inversamente proporcional a la intensidad de su interacción.

En la **Figura 31** mostramos la red de interacciones genéticas con los 500 genes de mayor (en rojo) y de menor (en verde) expresión en las células grandes con respecto a las pequeñas de nuestro experimento. Cuanto más cerca unos de otros, mayor es su interacción genética. Con las líneas de puntos suspensivos se muestran las áreas con una presencia muy significativa

de genes pertenecientes a esas categorías *GO_term* de procesos biológicos. Esto fue una forma de visualizar fácilmente como se agrupan y la intensidad de las interacciones genéticas entre los diferentes grupos de genes.

Pudimos apreciar la existencia de unas pocas zonas donde claramente había una mayor interacción entre los genes seleccionados. Por un lado, para los genes con mayor expresión en las células grandes observamos unas pocas agrupaciones con fuertes interacciones génicas, aunque no relacionadas con las categorías de *GO_term* de procesos biológicos mostradas. Mientras que, para los genes con una menor expresión en las células grandes, vimos que prácticamente solo había una gran región con fuertes interacciones genéticas, la correspondiente a los genes de las PR.

No solamente habíamos demostrado que la categoría de los genes de las proteínas ribosomales (PR) estaba enriquecida en genes con una menor expresión en las células grandes frente a las pequeñas, sino que además existían numerosos genes con fuertes interacciones génicas con ellos. Por otra parte, el número de genes es muy alto y su nivel de expresión es muy elevado, por lo que son unas de las proteínas más abundantes en la célula y el gasto energético que conllevan es enorme (Long and Dawid, 1980; Warner, 1999).

Por todo ello, y debido a su importancia, pensamos que los genes de las PR serían unos de los principales responsables del fenotipo observado en las células grandes, por lo que quisimos poner el foco en dicha categoría y conocer los mecanismos o las causas de su baja expresión en las células grandes. Deben existir diferentes motivos por los cuales algunos genes tienen una expresión insuficiente cuando disminuye su ploidía (Alcasabas et al., 2013; Pir et al., 2012). Podría ser debido a sus factores de transcripción o a una limitación de la RNA polimerasa II en su transcripción, en la iniciación o en la elongación. Vimos que ni los genes de los factores de transcripción de las PR, ni los de la RNA polimerasa II tuvieron una menor expresión de mRNA en las células grandes en nuestro análisis de RNAseq. Por lo que quisimos comprobar si existían problemas en su actividad, en la unión de éstos a los genes de las PR.

4.2. Unión de la RNA polimerasa II a los genes de las proteínas ribosomales durante su transcripción

En primer lugar, trataremos los factores generales de la transcripción, y si existen defectos o limitaciones en la velocidad o unión entre la RNA polimerasa II y los genes de las proteínas ribosomales.

Sobre la maquinaria de transcripción, tuvimos en cuenta los resultados de varios estudios. De acuerdo con los datos de unión obtenidos mediante CHIP de algunas de las proteínas de la RNA polimerasa II (Baejen et al., 2017; Paul et al., 2015), los de expresión génica mediante RNAseq (Galitski et al., 1999; Lipson et al., 2009) y de la vida media de sus mRNA (Chan et al., 2018), pudimos comprobar que la transcripción de los genes de las PR

funciona muy eficazmente en todas sus etapas, tanto en la iniciación, como en la elongación (**Figura 32**). El funcionamiento de la iniciación la observamos con Tbp1 (*TATA-binding protein*) o Spt15 en levaduras de gemación, el cual es un componente del complejo TFIID que se une a la secuencia *TATA*. Mientras que la elongación la analizamos tanto con Rpb1 (o Rpo21 en *Saccharomyces cerevisiae*) como con Rpb3, ambas subunidades muy importantes de la RNA polimerasa II. Rpb3 también forma parte del complejo de la RNA polimerasa II en la terminación de la transcripción, con lo que también nos daría información sobre esta última etapa.

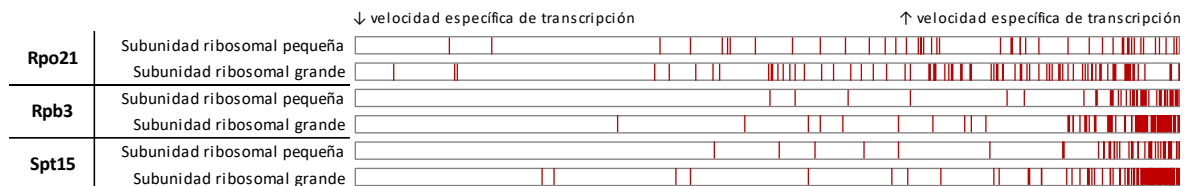


Figura 32: Velocidad específica de transcripción de los genes PR.

Representación de la eficiencia de transcripción o velocidad de transcripción por molécula de RNA polimerasa II (Rpo21, Rpb3 o Spt15) para los genes de las proteínas ribosomales (barras verticales en rojo), tanto para las subunidades grandes como para las pequeñas, calculada mediante la expresión siguiente: “expresión de moléculas de mRNA (FPKM) / (unión con la RNA polimerasa II (CPM) * vida media de los mRNA (min))”. Los genes están ordenados por su eficiencia de transcripción. Cuanto más a la derecha, mayor será dicha velocidad específica de transcripción para los genes de las PR. Adaptado del trabajo de (Baejen et al. 2017; Paul et al. 2015; Galitski et al. 1999; Lipson et al. 2009; Chan et al. 2018).

El problema en la expresión de los genes de las PR no estaría relacionado con la RNA polimerasa II, pues dichos genes muestran una alta velocidad específica de transcripción en todas las etapas, tanto para las subunidades grandes como para las pequeñas. Por ello, la maquinaria de transcripción difícilmente limitaría la expresión de los genes PR.

Si no eran los factores generales, pensamos que tal vez el problema estaría con los específicos, en su regulación por parte de los factores transcripcionales de las PR.

4.3. Los factores específicos de transcripción de los genes de las proteínas ribosomales muestran deficiencias en células grandes

Existen cuatro proteínas que controlan los genes de las proteínas ribosomales (Albert et al., 2016). Una se une al DNA (Rap1) y las otras tres forman un complejo uniéndose a ella (Sfp1, Lfh1 y Fhl1) para remodelar la cromatina y poder activar sus promotores.

Analizamos unos trabajos mediante ChIP (Albert et al., 2019; Knight et al., 2014) de la unión a los promotores de los genes de las PR por parte de los factores de transcripción de éstos (Rap1, Lfh1, Fhl1 y Sfp1). Los valores de unión a los factores de transcripción fueron

medidos según el número de *reads*. Cuanto más intenso es el color azul, más *reads* hay en la zona y mayor unión de los factores a los genes. Analizamos dichos datos (**Figura 33**) para nuestros genes de interés, los de las proteínas ribosomales, y los ordenamos por su valor de expresión diferencial ($\log_2(L/S)$) según nuestros experimentos de RNAseq, de menor (en verde claro) a mayor (verde oscuro), teniendo todos ellos valores negativos como ya sabíamos, pues tenían una menor expresión en las células grandes con respecto a las pequeñas.

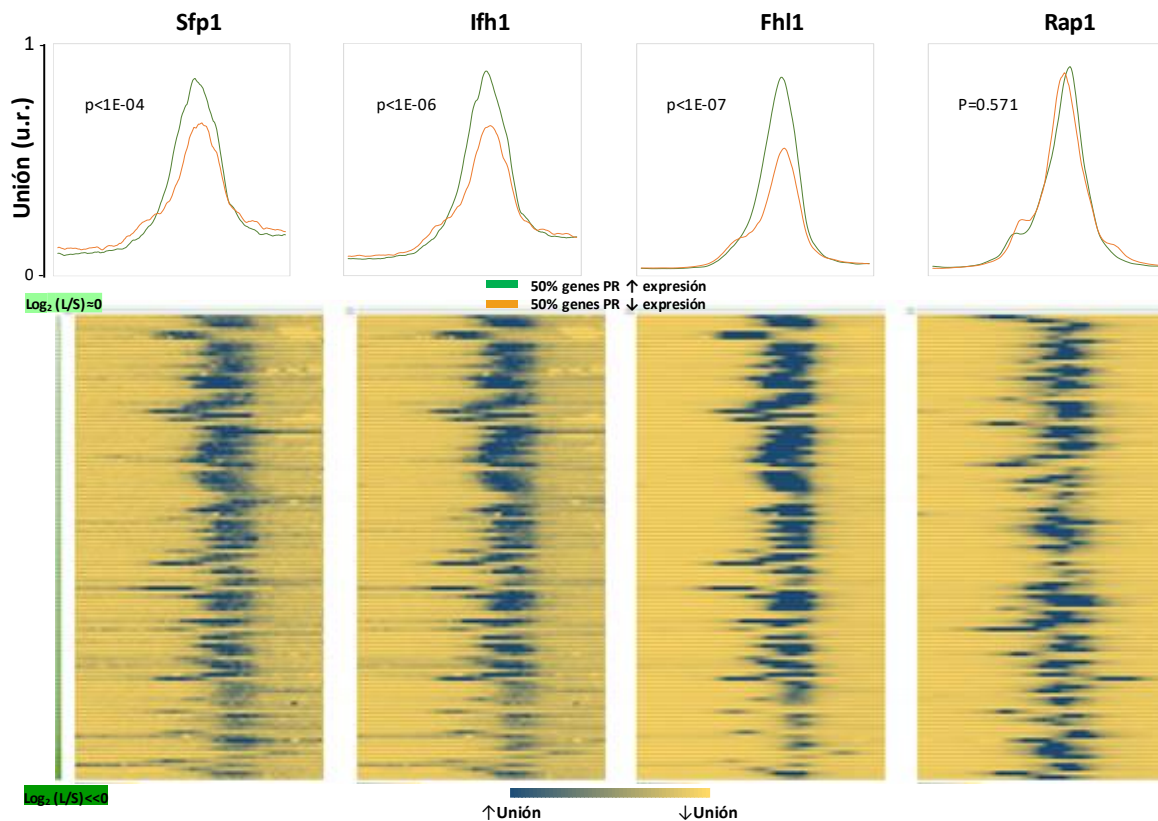


Figura 33: Análisis de unión de los factores de transcripción de los genes de las proteínas ribosomales.

Análisis de unión mediante CHIP de los factores de transcripción (estos son, Rap1, Lfh1, Fhl1 y Sfp1) para los genes de proteínas ribosomales. Éstos están ordenados de menor (verde claro) a mayor (verde oscuro) expresión diferencial entre las células grandes y las pequeñas, según nuestro estudio. Para cada una de las proteínas de estudio se muestran las zonas de unión a los genes de las proteínas ribosomales y la intensidad de dicha unión (en azul se muestra una unión más intensa). Las curvas de unión representan la suma total relativa de los valores de unión para el 50% de los genes de las PR con una mayor expresión en las células grandes (curva verde) y para el otro 50% de los genes (curva naranja), los cuales tenían una menor expresión en las células grandes, es decir, una mayor expresión diferencial entre las células grandes y las pequeñas ($\log_2(L/S) < 0$). Adaptado del trabajo de (Albert, Tomassetti, et al. 2019; Knight et al. 2014).

Como podemos apreciar en la **Figura 33**, los genes de las proteínas ribosomales con una menor expresión en las células grandes con respecto a las pequeñas muestran una menor unión o afinidad tanto por parte de Sfp1, como de Ifh1 y Fhl1. En cambio, Rap1 no presenta un enriquecimiento o distribución significativa (*p-value* de 0.57), es decir, no hay una correlación entre su unión a los genes de las PR y la expresión de éstos en las células grandes.

Por tanto, no sería problema de Rap1, el factor de transcripción que regula la unión al DNA, sino que serían los demás factores de transcripción de las PR los que no se estuviesen uniendo eficientemente a Rap1 en las células grandes.

Según el estudio mencionado anteriormente (Albert et al., 2016), la regulación de la síntesis de los genes de proteínas ribosomales no tenía lugar a nivel de unión al DNA por Rap1, que siempre estaría allí, mientras que Sfp1, Ifh1 y Fhl1 no. Estos tres factores de transcripción estarán allí en función de si son secuestrados o no por rRNA. Cuando éste se está procesando bien en el nucleolo, una proteína necesaria para ello, Utp22, queda allí retenida. Pero cuando no se está produciendo rRNA, ya no se da tal procesamiento, con lo que Utp22 queda libre y, junto a otras proteínas, es capaz de unirse y secuestrar a Ifh1. Con lo que dicho factor de transcripción ya no podrá activar la expresión de los genes de las PR, pues si no está Ifh1, tampoco se unirán Fhl1 ni Sfp1, siendo por ello una pieza clave en la regulación de éstos.

Quizá por ello, en el anterior análisis vimos que la correlación entre los datos de unión de los factores de transcripción a los genes de las proteínas ribosomales y su expresión en células grandes se daba a partir de Ifh1, y no de Rap1. Con lo cual, nos podría estar diciendo que ese es un punto importante de regulación y coordinación en la expresión de los genes de las PR, y donde el balance no está funcionando igual para las células grandes que para las pequeñas.

En resumen, estos datos indicarían que el déficit en la expresión de genes PR en las células grandes estaría mediada por una deficiente actividad de Ifh1, quizás por secuestro en el nucleolo. En este punto cabe señalar que las células grandes mostraron un nivel incrementado de expresión de genes nucleolares, apuntando a una situación de estrés nucleolar. Sin embargo, las células de tamaño mayor no muestran una inducción de los genes gobernados por Hsf1 o Msn2 (**Figura 34**), dos de los factores transcripcionales más importantes de la respuesta a estrés en la levadura de gemación.

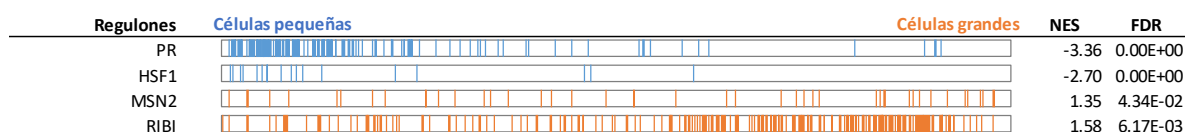


Figura 34:

Mismas representaciones que en la **Figura 28**, pero del enriquecimiento en genes pertenecientes a los regulones del RP, HSF1, MSN2 y RIBI, con diferente expresión para las células grandes frente a las pequeñas.

En naranja se indican los genes con una mayor expresión en células grandes. En azul se indican los genes con una mayor expresión en células pequeñas. NES (*Normalized enrichment score*).

Así, en caso de que el estrés nucleolar sea la clave de la menor eficiencia de crecimiento de las células de gran tamaño, éste no vendría acompañado de la limitación general de chaperonas moleculares, y su caracterización puede desvelar nuevos mecanismos que coordinen la síntesis de ribosomas con el tamaño celular y el crecimiento.

VI. Conclusiones

- Las células de levadura de gemación han determinado un tamaño crítico en START óptimo, en cuyo rango la velocidad específica de crecimiento de la yema en S-G2 (β/V_b) es máxima
- β/V_b depende del volumen de gemación (V_b), y disminuye tanto para volúmenes menores como sobre todo para V_b mayores a las células wt
- La velocidad específica de crecimiento en G1 (α/V) es independiente del volumen celular
- Las células wt muestran un mejor *fitness* tras la acumulación de varias generaciones de competición celular, tanto frente a células más pequeñas como más grandes
- A pesar de sus diferencias en el tamaño, las células haploides, diploides y tetraploides muestran similares velocidades específicas de crecimiento en S-G2
- La velocidad de transporte específica de Myo2 y Sec31 desde la madre a la yema disminuye con el volumen de gemación
- La expresión de Myo2 no disminuye a volúmenes grandes
- El número de cables de actina no disminuye con el tamaño celular ni con la ploidía
- La expresión de ciertas proteínas implicadas en crecimiento polarizado disminuye a volúmenes de gemación grandes
- Determinadas categorías funcionales muestran una expresión génica alterada en células grandes frente a pequeñas, afectando a genes relacionados con el transporte de vesículas y el crecimiento polarizado, pero sobre todo a los genes de las proteínas ribosomales

VII. Anexos

1. Abreviaturas

wt	Wild type
Vd	Volumen de la yema
T	Tiempo
TA	Temperatura ambiente
V	Volumen o tamaño celular de la célula madre (G1)
α	Velocidad de crecimiento en volumen de la célula madre (G1)
α/V	Velocidad específica de crecimiento en volumen de la célula madre (G1)
Vb	Volumen celular de la célula madre en la gemación
β	Velocidad de crecimiento en volumen de la yema (S-G2)
β/Vb	Velocidad específica de crecimiento en volumen de la yema (S-G2)
u.a.	Unidades arbitrarias
u.r.	Unidades relativas
Lat-A	Latrunculina A
L	Células grandes
S	Células pequeñas
RE	Retículo endoplasmático
PR	Proteínas ribosomales

2. Lista de cepas de levadura utilizadas en este estudio

Nombre	Fondo Genético	Genotipo	Procedencia
L-194	1788	<i>MATa/alpha leu2-3,112 ura3-52 trp1-1 his4 can1-r</i>	From David Levin's lab.(John's Hopkins, Baltimore)
L-200	CML128	<i>MATa, leu2-3,112, ura3-52, trp1, his4, can1.r</i>	C.Casas (from 1788)
L-344	BF305	<i>MATa leu2 his3 trp1 ura3 ade1 arg5,6 met14 cln3::URA3-GALp>CLN3 cln1::HIS3 cln2::TRP1</i>	B. Fitcher (Xiong et al., 1991)
#654	BY4741 (CYC262)	<i>MATa his3-Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	Gemma Reverter
#1712	BY4741 WHI5N	<i>WHI5N::sGFP-ADH1t-kanMX4</i>	Paco Ferrezuelo
#1747	BY4741 Whi5-GFP	<i>WHI5::yGFP-HIS3MX</i>	Invitrogen
#1748	BY4741 Whi5-GFP Δcln3	<i>WHI5::yGFP-HIS3MX cln3::URA3</i>	Martí Aldea
#1749	BY4741 Whi5-GFP Δwhi3	<i>WHI5::yGFP-HIS3MX whi3::URA3</i>	Martí Aldea
#1750	BY4741 Whi5-GFP Δydj1	<i>WHI5::yGFP-HIS3MX ydj1::URA3</i>	Martí Aldea
#1759	BY4741 Whi5-GFP Δcln1,2	<i>WHI5::yGFP-HIS3MX cln1::URA3, cln2::LEU2</i>	Neus Colomina
1454-Y	W303 1A mCherry	<i>ura3-1::NATNT2-pTEF-mCherry</i>	Joan Marc
1512-Y	CML128 TEFp-mCherry	<i>ura3-52::NATNT2-pTEF-mCherry</i>	Pedro Vidal (este estudio)
1514-Y	CML128 TEFp-GFP	<i>ura3-52::NATNT2-pTEF-GFP</i>	Pedro Vidal (este estudio)
1516-Y	CML128 whi5Δ TEFp-mCherry	<i>Δwhi5::KanMX4 ura3-52::NATNT2-pTEF-mCherry</i>	Pedro Vidal (este estudio)
1518-Y	CML128 cln3Δ TEFp-mCherry	<i>Δcln3::LEU2 ura3-52::NATNT2-pTEF-mCherry</i>	Pedro Vidal (este estudio)
1662-Y	BY4743	<i>Diploid from BY4741 and BY4742</i>	David Moreno
1669-Y	CML128 SEC31-GFP	<i>SEC31-yeGFP::kITRP1</i>	Pedro Vidal (este estudio)
1671-Y	CML128 whi5Δ SEC31-GFP	<i>Δwhi5::KanMX4 SEC31-yeGFP::kITRP1</i>	Pedro Vidal (este estudio)
1673-Y	CML128 cln3Δ SEC31-GFP	<i>Δcln3::LEU2 SEC31-yeGFP::kITRP1</i>	Pedro Vidal (este estudio)
1746-Y	CML128 Myo2-GFP	<i>Myo2-yeGFP:kITRP1</i>	Pedro Vidal (este estudio)
1748-Y	CML128 Δwhi5 Myo2-GFP	<i>Δwhi5::KanMX4 Myo2-yeGFP:kITRP1</i>	Pedro Vidal (este estudio)
1750-Y	CML128 Δcln3 Myo2-GFP	<i>Δcln3::LEU2 Myo2-yeGFP:kITRP1</i>	Pedro Vidal (este estudio)
1779-Y	CML128 Myo2-GFP Δydj1	<i>Myo2-yeGFP:kITRP1 Δydj1::NATMX4</i>	Pedro Vidal (este estudio)

1880-Y	BF305 Sec31-GFP	<i>GALp-CLN3, cln1::HIS3, cln2::TRP1, leu2, ura3, ade1, arg5,6, met14 Sec31::sGFP-KanMX4</i>	Pedro Vidal (este estudio)
1886-Y	BF305 Myo2-GFP	<i>GALp-CLN3, cln1::HIS3, cln2::TRP1, leu2, ura3, ade1, arg5,6, met14 Myo2::sGFP-KanMX4</i>	Pedro Vidal (este estudio)
1890-Y	CML128 Abp140-GFP	<i>Abp140::yeGFP-kITRP1</i>	Pedro Vidal (este estudio)
1891-Y	1788 Abp140-GFP/Abp140	<i>Diploid Abp140::yeGFP-kITRP1/Abp140</i>	Pedro Vidal (este estudio)
1901-Y	BF305 Abp140-GFP	<i>GALp-CLN3, cln1::HIS3, cln2::TRP1, leu2, ura3, ade1, arg5,6, met14 Abp140::sGFP-KanMX4</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2007-Y	BF305 Psa1-GFP	<i>GALp-CLN3, cln1::HIS3, cln2::TRP1, leu2, ura3, ade1, arg5,6, met14 Psa1::sGFP-KanMX4</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2009-Y	BF305 Sur4-GFP	<i>GALp-CLN3, cln1::HIS3, cln2::TRP1, leu2, ura3, ade1, arg5,6, met14 Sur4::sGFP-KanMX4</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2011-Y	BF305 Emp24-GFP	<i>GALp-CLN3, cln1::HIS3, cln2::TRP1, leu2, ura3, ade1, arg5,6, met14 Emp24::sGFP-KanMX4</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2015-Y	BF305 Pmi40-GFP	<i>GALp-CLN3, cln1::HIS3, cln2::TRP1, leu2, ura3, ade1, arg5,6, met14 PMI40::sGFP-KanMX4</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2028-Y	BF305 Erv25-GFP	<i>GALp-CLN3, cln1::HIS3, cln2::TRP1, leu2, ura3, ade1, arg5,6, met14 Erv25::sGFP-KanMX4</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2030-Y	BF305 Vrg4-GFP	<i>GALp-CLN3, cln1::HIS3, cln2::TRP1, leu2, ura3, ade1, arg5,6, met14 Vrg4::sGFP-KanMX4</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2085-Y	BF305 Rps0A-GFP	<i>GALp-CLN3, cln1::HIS3, cln2::TRP1, leu2, ura3, ade1, arg5,6, met14 Rps0A::sGFP-KanMX4</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2087-Y	BF305 Rpl19A-GFP	<i>GALp-CLN3, cln1::HIS3, cln2::TRP1, leu2, ura3, ade1, arg5,6, met14 Rpl19A::sGFP-KanMX4</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2089-Y	BF305 Rps4B-GFP	<i>GALp-CLN3, cln1::HIS3, cln2::TRP1, leu2, ura3, ade1, arg5,6, met14 Rps4B::sGFP-KanMX4</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2091-Y	BF305 Rpl13A-GFP	<i>GALp-CLN3, cln1::HIS3, cln2::TRP1, leu2, ura3, ade1, arg5,6, met14 Rpl13A::sGFP-KanMX4</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2096-Y	PY5998	<i>BY matΔ::pSTE5-ura3::TRP1 ste4Δ::HygroR trp1::NatR::pGAL-ceCFP-tADH-SpHIS5</i>	(Sorenson et al., 2015)
2098-Y	PY6008	<i>BY (2x) matΔ::pSTE5-ura3::TRP1 ste4Δ::HygroR trp1::NatR::pGAL-ceCFP-tADH-SpHIS5</i>	(Sorenson et al., 2015)
2099-Y	PY6031	<i>BY (4x) matΔ::pSTE5-ura3::TRP1 ste4Δ::HygroR trp1::NatR::pGAL-ceCFP-tADH-SpHIS5</i>	(Sorenson et al., 2015)
2241-Y	yZX979	<i>BY MATa/a/a/a his3D1 leu2D0 lys2D0/LYS2 MET15/met15D0 ura3D0</i>	(Xie et al., 2018)

2187-Y	yXZX979 Δcdc19/Δcdc19/ Δcdc19	<i>Tetraploid BY cdc19::LEU2MX5/ cdc19::CaURA3MX4/cdc19::SpHIS3MX6/ CDC19</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2189-Y	yXZX979 Δeis1/Δeis1/Δeis1	<i>Tetraploid BY eis1::LEU2MX5/ eis::CaURA3MX4/esi1::SpHIS3MX6/EIS1</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2193-Y	yXZX979 Δput2/Δput2/ Δput2	<i>Tetraploid BY put2::LEU2MX5/ put2::CaURA3MX4/put2::SpHIS3MX6/ PUT2</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2220-Y	yXZX979 Δpep4/Δpep4/Δpep4	<i>Tetraploid BY pep4::LEU2MX5/ pep4::CaURA3MX4/pep4::SpHIS3MX6/ PEP4</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2222-Y	yXZX979 Δusv1/Δusv1/Δusv1	<i>Tetraploid BY usv1::LEU2MX5/ usv1::CaURA3MX4/usv1::SpHIS3MX6/ USV1</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2224-Y	yXZX979 Δcwp1/Δcwp1/Δcwp1	<i>Tetraploid BY cwp1::LEU2MX5/ cwp1::CaURA3MX4/cwp1::SpHIS3MX6/ CWP1</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2226-Y	yXZX979 Δpsa1/Δpsa1/Δpsa1	<i>Tetraploid BY psa1::LEU2MX5/ psa1::CaURA3MX4/psa1::SpHIS3MX6/ PSA1</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2352-Y	yXZX979 Δrps21a/ Δrps21a/Δrps21a	<i>Tetraploid BY rps21a::LEU2MX5/ rps21a::CaURA3MX4/rps21a::SpHIS3MX6/ RPS21a</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2375-Y	yXZX979 Δtub1/Δtub1/Δtub1	<i>Tetraploid BY tub1::LEU2MX5/ tub1::CaURA3MX4/tub1::SpHIS3MX6/ TUB1</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2377-Y	yXZX979 Δarp7/Δarp7/Δarp7	<i>Tetraploid BY arp7::LEU2MX5/ arp7::CaURA3MX4/arp7::SpHIS3MX6/ ARP7</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2379-Y	yXZX979 Δchc1/Δchc1/Δchc1	<i>Tetraploid BY chc1::LEU2MX5/ chc1::CaURA3MX4/chc1::SpHIS3MX6/ CHC1</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2381-Y	yXZX979 Δchs2/Δchs2/Δchs2	<i>Tetraploid BY chs2::LEU2MX5/ chs2::CaURA3MX4/chs2::SpHIS3MX6/ CHS2</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2385-Y	yXZX979 Δcdc12/Δcdc12/ Δcdc12	<i>Tetraploid BY cdc12::LEU2MX5/ cdc12::CaURA3MX4/cdc12::SpHIS3MX6/ CDC12</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2387-Y	yXZX979 Δbem1/Δbem1/ Δbem1	<i>Tetraploid BY bem1::LEU2MX5/ bem1::CaURA3MX4/bem1::SpHIS3MX6/ BEM1</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2389-Y	yXZX979 Δpma1/Δpma1/Δpma1	<i>Tetraploid BY pma1::LEU2MX5/ pma1::CaURA3MX4/pma1::SpHIS3MX6/ PMA1</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2391-Y	yXZX979 Δrps20/Δrps20/Δrps20	<i>Tetraploid BY rps20::LEU2MX5/ rps20::CaURA3MX4/rps20::SpHIS3MX6/ RPS20</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2411-Y	yXZX979 Δfba1/Δfba1/Δfba1	<i>Tetraploid BY fba1::LEU2MX5/ fba1::CaURA3MX4/fba1::SpHIS3MX6/ FBA1</i>	Pedro Vidal (este estudio)
2438-Y	yXZX979 Δrpl5/Δrpl5/Δrpl5	<i>Tetraploid BY rpl5::LEU2MX5/ rpl5::CaURA3MX4/rpl5::SpHIS3MX6/ RPL5</i>	Pedro Vidal (este estudio)

3. Lista de plásmidos utilizados para este estudio

Nombre	Fondo Genético	Descripción	Procedencia
B-1	YCplac33	<i>Polylinker de pUC19. Contiene URA3, ARS1, CEN4 de S. cerevisiae.</i>	(Gietz and Sugino, 1988)
B-3	YCplac22	<i>Polylinker de pUC19. Contiene TRP1, ARS1, CEN4 de S. cerevisiae.</i>	(Gietz and Sugino, 1988)
URA3MX4	pAG60	<i>URA3MX4</i>	
HIS3MX6	pFA6a-HIS3MX6	<i>HIS3MX6</i>	
LEU2MX5	pCM376	<i>LEU2MX5</i>	
NATMX4	pAG25	<i>natMX4</i>	
GFPKAN	pCYC86	<i>sGFP-NUF2t-kanMX4</i>	
pYM26	pCYC656	<i>yeGFP:kITRP1</i>	(Janke et al., 2004)
pYM-N21	pCYC626	<i>TEF Promoter, yeGFP:natNT2</i>	(Janke et al., 2004)

VIII. Bibliografía

- Albert, B., Knight, B., Merwin, J., Martin, V., Ottoz, D., Gloor, Y., Bruzzone, M.J., Rudner, A., and Shore, D. (2016). A Molecular Titration System Coordinates Ribosomal Protein Gene Transcription with Ribosomal RNA Synthesis. *Mol. Cell* *64*, 720–733.
- Albert, B., Tomassetti, S., Gloor, Y., Dilg, D., Mattarocci, S., Kubik, S., Hafner, L., and Shore, D. (2019). Sfp1 regulates transcriptional networks driving cell growth and division through multiple promoter-binding modes. *Genes Dev.* *33*, 288–293.
- Alcasabas, A.A., De Clare, M., Pir, P., and Oliver, S.G. (2013). Control analysis of the eukaryotic cell cycle using gene copy-number series in yeast tetraploids. *BMC Genomics* *14*.
- Aldea, M., Garí, E., and Colomina, N. (2007). Control of cell cycle and cell growth by molecular chaperones. *Cell Cycle* *6*, 2599–2603.
- Aldea, M., Jenkins, K., and Csikász-Nagy, A. (2017). Growth Rate as a Direct Regulator of the Start Network to Set Cell Size. *Front. Cell Dev. Biol.* *5*.
- Andalis, A.A., Storchova, Z., Styles, C., Galitski, T., Pellman, D., and Fink, G.R. (2004). Defects arising from whole-genome duplications in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *167*, 1109–1121.
- Ariño, J. (2010). Integrative responses to high pH stress in *S. cerevisiae*. *OMICS* *14*, 517–523.
- Asakura, T., Sasaki, T., Nagano, F., Satoh, A., Obaishi, H., Nishioka, H., Imamura, H., Hotta, K., Tanaka, K., Nakanishi, H., et al. (1998). Isolation and characterization of a novel actin filament-binding protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Oncogene* *16*, 121–130.
- Ayscough, K.R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P., and Drubin, D.G. (1997). High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J. Cell Biol.* *137*, 399–416.
- Baejen, C., Andreani, J., Torkler, P., Battaglia, S., Schwalb, B., Lidschreiber, M., Maier, K.C., Boltendahl, A., Rus, P., Esslinger, S., et al. (2017). Genome-wide Analysis of RNA Polymerase II Termination at Protein-Coding Genes. *Mol. Cell* *66*, 38-49.e6.
- Baena, E., Gandarillas, A., Vallespinós, M., Zanet, J., Bachs, O., Redondo, C., Fabregat, I., Martínez-A, C., and de Alborán, I.M. (2005). c-Myc regulates cell size and ploidy but is not essential for postnatal proliferation in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 7286–7291.
- Barbet, N.C., Schneider, U., Helliwell, S.B., Stansfield, I., Tuite, M.F., and Hall, M.N. (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol. Biol. Cell* *7*, 25–42.
- Barton, A.A. (1950). Some Aspects of Cell Division in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* *4*, 84–86.
- Baserga, R. (2007). Is cell size important? *Cell Cycle* *6*, 814–816.
- Berman, J. (2016). Ploidy plasticity: A rapid and reversible strategy for adaptation to stress. *FEMS Yeast Res.* *16*.
- Bernstein, K.A., Bleichert, F., Bean, J.M., Cross, F.R., and Baserga, S.J. (2007). Ribosome biogenesis is sensed at the Start cell cycle checkpoint. *Mol. Biol. Cell* *18*, 953–964.

- Bickford, L.C., Mossessova, E., and Goldberg, J. (2004). A structural view of the COPII vesicle coat. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *14*, 147–153.
- Bloom, J., and Cross, F.R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 149–160.
- Blume, J. Von, Duran, J.M., Forlanelli, E., Alleaume, A., Egorov, M., Polishchuk, R., Molina, H., and Malhotra, V. (2009). Actin remodeling by ADF/cofilin is required for cargo sorting at the trans-Golgi network. *JCB* *187*, 1055–1069.
- Booher, R.N., Deshaies, R.J., and Kirschner, M.W. (1993). Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *EMBO J.* *12*, 3417–3426.
- Botstein, D., and Fink, G.R. (1988). Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science* *240*, 1439–1443.
- Botstein, D., and Fink, G.R. (2011). Yeast: An experimental organism for 21st century biology. *Genetics* *189*, 695–704.
- Bretscher, A. (2003). Polarized growth and organelle segregation in yeast: The tracks, motors, and receptors. *J. Cell Biol.* *160*, 811–816.
- Brewer, B.J., Chlebowicz-Sledziewska, E., and Fangman, W.L. (1984). Cell cycle phases in the unequal mother/daughter cell cycles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *4*, 2529–2531.
- De Bruin, R.A.M., McDonald, W.H., Kalashnikova, T.I., Yates, J., and Wittenberg, C. (2004). Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell* *117*, 887–898.
- Carroll, A.S., and O’Shea, E.K. (2002). Pho85 and signaling environmental conditions. *Trends. Biochem. Sci.* *27*, 87–93.
- Casas, C., Aldea, M., Espinet, C., Gallego, C., Gil, R., and Herrero, E. (1997). The AFT1 transcriptional factor is differentially required for expression of high-affinity iron uptake genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *13*, 621–637.
- Chan, Y.-H.M., and Marshall, W.F. (2010). Scaling properties of cell and organelle size. *Organogenesis* *6*, 88–96.
- Chan, L.Y., Mugler, C.F., Heinrich, S., Vallotton, P., and Weis, K. (2018). Non-invasive measurement of mRNA decay reveals translation initiation as the major determinant of mRNA stability. *Elife* *7*.
- Charvin, G., Oikonomou, C., Siggia, E.D., and Cross, F.R. (2010). Origin of irreversibility of cell cycle start in budding yeast. *PLoS Biol.* *8*.
- Cho, R.J., Campbell, M.J., Winzler, E.A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T.G., Gabrielian, A.E., Landsman, D., Lockhart, D.J., et al. (1998a). A Genome-Wide Transcriptional Analysis of the Mitotic Cell Cycle. *Mol. Cell* *2*, 65–73.

- Cho, R.J., Campbell, M.J., Winzeler, E.A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T.G., Gabrielian, A.E., Landsman, D., Lockhart, D.J., et al. (1998b). A Genome-Wide Transcriptional Analysis of the Mitotic Cell Cycle including control of mRNA transcription. *Mol. Cell* 2, 65–73.
- Colman-Lerner, A., Chin, T.E., and Brent, R. (2001). Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* 107, 739–750.
- Colomina, N., Ferrezuelo, F., Vergés, E., Aldea, M., and Garí, E. (2009). Whi3 regulates morphogenesis in budding yeast by enhancing Cdk functions in apical growth. *Cell Cycle* 8, 1912–1920.
- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.* 6, 836–846.
- Di Como, C.J., Chang, H., and Arndt, K.T. (1995). Activation of CLN1 and CLN2 G1 cyclin gene expression by BCK2. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1835–1846.
- Cook, M., and Tyers, M. (2007). Size control goes global. *Curr. Opin. Biotech.* 18, 341–350.
- Cooper, S. (2004). Control and maintenance of mammalian cell size. *BMC Cell Biol.* 5, 1–21.
- Cosma, M.P. (2004). Daughter-specific repression of *Saccharomyces cerevisiae* HO: Ash1 is the commander. *EMBO Rep.* 5, 953–957.
- Costanzo, M., VanderSluis, B., Koch, E.N., Baryshnikova, A., Pons, C., Tan, G., Wang, W., Usaj, M., Hanchard, J., Lee, S.D., et al. (2016). A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. *Science* (80-.). 353.
- Cross, F.R. (1988). DAF1, a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8, 4675–4684.
- Cross, F.R., and Blake, C.M. (1993). The yeast Cln3 protein is an unstable activator of Cdc28. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3266–3271.
- Dahmann, C., Diffley, J.F.X., and Nasmyth, K.A. (1995). S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state. *Curr. Biol.* 5, 1257–1269.
- Dann, S.G., and Thomas, G. (2006). The amino acid sensitive TOR pathway from yeast to mammals. *FEBS Lett.* 580, 2821–2829.
- Dirick, L., Böhm, T., and Nasmyth, K. (1995). Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14, 4803–4813.
- Dohlman, H.G., and Slessareva, J.E. (2006). Pheromone signaling pathways in yeast. *Sci. STKE* 2006, cm6.
- Dolznic, H., Grebien, F., Sauer, T., Beug, H., and Müllner, E.W. (2004). Evidence for a size-sensing mechanism in animal cells. *Nat. Cell Biol.* 6, 899–905.
- Donachie, W. (1968). Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. *Nature* 219, 1077–1079.

- Donachie, W.D., and Blakely, G.W. (2003). Coupling the initiation of chromosome replication to cell size in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* *6*, 146–150.
- Donovan, K.W., and Bretscher, A. (2012). Myosin-V Is Activated by Binding Secretory Cargo and Released in Coordination with Rab/Exocyst Function. *Dev. Cell* *23*, 769–781.
- Donovan, K.W., and Bretscher, A. (2015). Tracking individual secretory vesicles during exocytosis reveals an ordered and regulated process. *J. Cell Biol.* *210*, 181–189.
- Du, Y., Ferro-Novick, S., and Novick, P. (2004). Dynamics and inheritance of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* *117*, 2871–2878.
- Dungrawala, H., Hua, H., Wright, J., Abraham, L., Kasemsri, T., McDowell, A., Stilwell, J., and Schneider, B.L. (2012). Identification of new cell size control genes in *S. cerevisiae*. *Cell Div.* *7*, 24.
- Espinoza, F.H., Farrell, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Morgan, D.O. (1996). A cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) in budding yeast unrelated to vertebrate CAK. *Science* *273*, 1714–1717.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* *33*, 389–396.
- Fagarasanu, A., and Rachubinski, R.A. (2007). Orchestrating organelle inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Microbiol.* *10*, 528–538.
- Fantes, P.A., Grant, W.D., and Pritchard, R.H. (1975). The Regulation of Cell Size and the Control of Mitosis. *J. Theor. Biol.* *50*, 213–244.
- Farkas, V., Kovarik, J., Kosinova, A., and Bauer, S. (1974). Autoradiographic study of mannan incorporation into the growing cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *117*, 265–269.
- Ferrezuelo, F., Colomina, N., Futcher, B., and Aldea, M. (2010). The transcriptional network activated by Cln3 cyclin at the G1-to-S transition of the yeast cell cycle. *Genome Biol.* *11*, R67.
- Ferrezuelo, F., Colomina, N., Palmisano, A., Garí, E., Gallego, C., Csikász-Nagy, A., and Aldea, M. (2012). The critical size is set at a single-cell level by growth rate to attain homeostasis and adaptation. *Nat. Commun.* *3*.
- Forsburg, S., and Nurse, P. (1991). Cell Cycle Regulation in the Yeasts *Saccharomyces Cerevisiae* and *Schizosaccharomyces Pombe*. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1–30.
- Foury, F. (1997). Human genetic diseases: A cross-talk between man and yeast. *Gene* *195*, 1–10.
- Futcher, B. (1996). Cyclins and the wiring of the yeast cell cycle. *Yeast* *12*, 1635–1646.
- Futcher, B. (2002). Transcriptional regulatory networks and the yeast cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 676–683.
- Galitski, T., Saldanha, A.J., Styles, C.A., Lander, E.S., and Fink, G.R. (1999). Ploidy regulation of gene expression. *Science* (80-.). *285*, 251–254.

- Gietz, R.D., and Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 527–534.
- Ginzberg, M.B., Kafri, R., and Kirschner, M. (2015). On being the right (cell) size. *Science* (80-). 348, 1–10.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., et al. (1996). Life with 6000 Genes. *Science* (80-). 274, 546–567.
- Grebien, F., Dolznig, H., Beug, H., and Mullner, E.W. (2005). Cell size control: new evidence for a general mechanism. *Cell Cycle* 4, 418–421.
- Gregory, T.R. (2001). Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 76, 65–101.
- Greig, D., and Leu, J.-Y. (2009). Natural history of budding yeast. *Curr. Biol.* 19, R886–90.
- Harris, L.K., and Theriot, J.A. (2016). Relative rates of surface and volume synthesis set bacterial cell size. *Cell* 165, 1479–1492.
- Hartwell, L.H. (1971). Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp. Cell Res.* 69, 265–276.
- Hartwell, L.H. (1973). Three additional genes required for deoxyribonucleic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 115, 966–974.
- Hartwell, L.H., and Unger, M.W. (1977). Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division. *J. Cell Biol.* 75, 422–435.
- Haucke, V. (2003). Vesicle budding: A coat for the COPs. *Trends Cell Biol.* 13, 59–60.
- Heim, R., Cubitt, a B., and Tsien, R.Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature* 373, 663–664.
- Hernández-Ortega, S., Bru, S., Ricco, N., Ramírez, S., Casals, N., Jiménez, J., Isasa, M., Crosas, B., and Clotet, J. (2013). Defective in mitotic arrest 1 (Dma1) ubiquitin ligase controls G 1 cyclin degradation. *J. Biol. Chem.* 288, 4704–4714.
- Hill, N.S., Kadoya, R., Chatteraj, D.K., Levin, P.A., and Hughes, P. (2012). Cell Size and the Initiation of DNA Replication in Bacteria. *PLoS Genet.* 8, e1002549.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic adaptation in yeast-control of the yeast osmolyte system. *Int. Rev. Cytol.* 215, 149–187.
- Hohmann, S., Krantz, M., and Nordlander, B. (2007). Yeast Osmoregulation. *Method. Enzym.* 428, 29–45.
- Huang, D., Friesen, H., and Andrews, B. (2007). Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol. Microbiol.* 66, 303–314.
- Hurley, J.H. (2010). Review-Membrane Budding. *Cell* 143, 875–887.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart,

- A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., et al. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* *21*, 947–962.
- Johnston, G.C., Pringle, J.R., and Hartwell, L.H. (1977). Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell Res.* *105*, 79–98.
- Johnston, G.C., Ehrhardt, C.W., Lorincz, A., and Carter, B.L.A. (1979). Regulation of cell size in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *137*, 1–5.
- Jorgensen, P., Nishikawa, J.L., Breikreutz, B.J., and Tyers, M. (2002). Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* (80-.). *297*, 395–400.
- Joska, T.M., Mashruwala, A., Boyd, J.M., and Belden, W.J. (2014). A universal cloning method based on yeast homologous recombination that is simple, efficient, and versatile.
- Kennedy, B.K., Austriaco, N.R., and Guarente, L. (1994). Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span. *J. Cell Biol.* *127*, 1985–1993.
- Knight, B., Kubik, S., Ghosh, B., Bruzzone, M.J., Geertz, M., Martin, V., Déneraud, N., Jacquet, P., Ozkan, B., Rougemont, J., et al. (2014). Two distinct promoter architectures centered on dynamic nucleosomes control ribosomal protein gene transcription. *Genes Dev.* *28*, 1695–1709.
- Knobloch, B., and Rachubinski, R.A. (2015). Motors, Anchors, and Connectors: Orchestrators of Organelle Inheritance. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *31*, 55–81.
- Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J.P., Gannon, J., and Hunt, T. (1992). Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol. Biol. Cell* *3*, 1279–1294.
- Koch, C., Moll, T., Neuberg, M., Ahorn, H., and Nasmyth, K. (1993). A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science* *261*, 1551–1557.
- Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C.J., Gansler, T.S., Holland, J.F., and Frei, E.I. (2003). *Holland-Frei Cancer Medicine*, 6th edition.
- Laabs, T.L., Markwardt, D.D., Slattery, M.G., Newcomb, L.L., Stillman, D.J., and Heideman, W. (2003). ACE2 is required for daughter cell-specific G1 delay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10275–10280.
- Lee, K.S., and Levin, D.E. (1992). Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 172–182.
- Leitao, R.M., and Kellogg, D.R. (2017). The duration of mitosis and daughter cell size are modulated by nutrients in budding yeast. *J. Cell Biol.* *216*, 3463–3470.
- Lew, D.J., and Reed, S.I. (1993). Morphogenesis in the yeast cell cycle: Regulation by Cdc28 and cyclins. *J. Cell Biol.* *120*, 1305–1320.

- Lipson, D., Raz, T., Kieu, A., Jones, D.R., Giladi, E., Thayer, E., Thompson, J.F., Letovsky, S., Milos, P., and Causey, M. (2009). Quantification of the yeast transcriptome by single-molecule sequencing. *Nat. Biotechnol.* *27*, 652–658.
- Lloyd, A.C. (2013). The regulation of cell size. *Cell* *154*, 1194.
- Long, E.O., and Dawid, I.B. (1980). Repeated Genes in Eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* *49*, 727–764.
- Lord, P.G., and Wheals, A.E. (1983). Rate of cell cycle initiation of yeast cells when cell size is not a rate-determining factor. *J. Cell Sci.* *Vol. 59*, 183–201.
- Lubischer, J.L. (2007). The Cell Cycle, Principles of Control. David O. Morgan. *Integr. Comp. Biol.* *47*, 794–795.
- Lun, A.T.L., Chen, Y., and Smyth, G.K. (2016). Differential Expression Analyses of RNA-seq Experiments Using Quasi-Likelihood Methods in edgeR. *Stat. Genomics* *1418*, 391–416.
- Manukyan, A., Zhang, J., Thippeswamy, U., Yang, J., Zavala, N., Mudannayake, M.P., Asmussen, M., Schneider, C., and Schneider, B.L. (2008). Ccr4 alters cell size in yeast by modulating the timing of CLN1 and CLN2 expression. *Genetics* *179*, 345–357.
- Marshall, W.F., Young, K.D., Swaffer, M., Wood, E., Nurse, P., Kimura, A., Frankel, J., Wallingford, J., Walbot, V., Qu, X., et al. (2012). What determines cell size? *BMC Biol.* *10*.
- Mayer, V.W., and Aguilera, A. (1990). High levels of chromosome instability in polyploids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* *231*, 177–186.
- Mazel, T. (2017). Crosstalk of cell polarity signaling pathways. *Protoplasma* *254*, 1241–1258.
- Mendenhall, M.D., and Hodge, A.E. (1998a). Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* *62*, 1191–1243.
- Mendenhall, M.D., and Hodge, A.E. (1998b). Regulation of Cdc28 Cyclin-Dependent Protein Kinase Activity during the Cell Cycle of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 1191–1243.
- Menoyo, S., Ricco, N., Bru, S., Hernandez-Ortega, S., Escote, X., Aldea, M., and Clotet, J. (2013). Phosphate-Activated Cyclin-Dependent Kinase Stabilizes G1 Cyclin To Trigger Cell Cycle Entry. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 1273–1284.
- Mitchison, J. (2003). Growth during the cell cycle. *Int Rev Cytol* *226*, 165–258.
- Moll, T., Schwob, E., Koch, C., Moore, A., Auer, H., and Nasmyth, K. (1993). Transcription factors important for starting the cell cycle in yeast. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *340*, 351–360.
- Moore, S.A. (1988). Kinetic evidence for a critical rate of protein synthesis in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell cycle. *J Biol Chem* *263*, 9674–9681.
- Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., et al. (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* *34*,

267–273.

Moretto, F., Sagot, I., Daignan-Fornier, B., and Pinson, B. (2013). A pharmaco-epistasis strategy reveals a new cell size controlling pathway in yeast. *Mol. Syst. Biol.* *9*, 707.

Morgan, D.O. (2007). *The Cell Cycle: Principles of Control* (New Science Press).

Mortimer, R.K. (1958). Radiobiological and genetic studies on a polyploid series (haploid to hexaploid) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Radiat. Res.* *9*, 312–326.

Mortimer, R.K., and Johnston, J.R. (1986). Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* *113*, 35–43.

Mortimer, R.K., and Johnston, J.R. (1959). Life span of individual yeast cells. *Nature* *183*, 1751–1752.

Mundkur, B.D. (1953). Interphase nuclei and cell sizes in a polyploid series of *Saccharomyces*. *Experientia* *9*, 373–374.

de Nadal, E., Alepuz, P.M., and Posas, F. (2002). Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO Rep.* *3*, 735–740.

Nash, R., Tokiwa, G., Anand, S., Erickson, K., and Futcher, B. (1988). The *WHI1+* gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. *EMBO J.* *7*, 4335–4346.

Nash, R.S., Volpe, T., and Futcher, B. (2001). Isolation and characterization of *WHI3*, a size-control gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *157*, 1469–1480.

Nasmyth, K., and Dirick, L. (1991). The role of *SWI4* and *SWI6* in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell* *66*, 995–1013.

Novo, M., Mangado, A., Quirós, M., Morales, P., Salvadó, Z., and Gonzalez, R. (2013). Genome-Wide Study of the Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to the Early Stages of Wine Fermentation. *PLoS One* *8*, 1–15.

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

Ohya, Y., Sese, J., Yukawa, M., Sano, F., Nakatani, Y., Saito, T.L., Saka, A., Fukuda, T., Ishihara, S., Oka, S., et al. (2005). High-dimensional and large-scale phenotyping of yeast mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 19015–19020.

Paul, E., Tirosh, I., Lai, W., Buck, M.J., Palumbo, M.J., and Morse, R.H. (2015). Chromatin mediation of a transcriptional memory effect in yeast. *G3 Genes, Genomes, Genet.* *5*, 829–838.

Peyton Green, W. (1923). *The Man From the Atom*.

Pir, P., Gutteridge, A., Wu, J., Rash, B., Kell, D.B., Zhang, N., and Oliver, S.G. (2012). The genetic control of growth rate: A systems biology study in yeast. *BMC Syst. Biol.* *6*.

Polymenis, M., and Schmidt, E. V. (1997). Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin *CLN3* in yeast. *Gene Dev.* *11*, 2522–2531.

- Popolo, L., Vanoni, M., and Alberghina, L. (1982). Control of the yeast cell cycle by protein synthesis. *Exp. Cell Res.* *142*, 69–78.
- Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y., and Bretscher, A. (2004). Mechanisms of Polarized Growth and Organelle Segregation in Yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 559–591.
- Pruyne, D.W., Schott, D.H., and Bretscher, A. (1998). Tropomyosin-containing actin cables direct the Myo2p-dependent polarized delivery of secretory vesicles in budding yeast. *J. Cell Biol.* *143*, 1931–1945.
- Richardson, H., Lew, D.J., Henze, M., Sugimoto, K., and Reed, S.I. (1992). Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2. *Gene. Dev.* *6*, 2021–2034.
- Russell, P., Moreno, S., and Reed, S.I. (1989). Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts. *Cell* *57*, 295–303.
- Schmoller, K.M., Turner, J.J., Kõivomägi, M., and Skotheim, J.M. (2015). Dilution of the cell cycle inhibitor Whi5 controls budding-yeast cell size. *Nature* *526*, 268–272.
- Schott, D.H., Collins, R.N., and Bretscher, A. (2002). Secretory vesicle transport velocity in living cells depends on the myosin-V lever arm length. *J. Cell Biol.* *156*, 35–39.
- Schuberth, C., and Wedlich-Söldner, R. (2015). Building a patchwork - The yeast plasma membrane as model to study lateral domain formation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1853*, 767–774.
- Schwob, E., and Nasmyth, K. (1993). CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene. Dev.* *7*, 1160–1175.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., and Tsien, R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* *22*, 1567–1572.
- Shi, L., and Tu, B.P. (2013). Acetyl-CoA induces transcription of the key G1 cyclin CLN3 to promote entry into the cell division cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 7318–7323.
- Shilo, B., Riddle, V.G.H., and Pardee, A.B. (1979). Protein turnover and cell-cycle initiation in yeast. *Exp. Cell Res.* *123*, 221–227.
- Skotheim, J.M., Di Talia, S., Siggia, E.D., and Cross, F.R. (2008). Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. *Nature* *454*, 291–296.
- Slansky, J.E., and Farnham, P.J. (1996). Introduction to the E2F family: protein structure and gene regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* *208*, 1–30.
- Slavov, N., and Botstein, D. (2011). Coupling among growth rate response, metabolic cycle, and cell division cycle in yeast. *Mol. Biol. Cell* *22*, 1997–2009.
- Smets, B., Ghillebert, R., De Snijder, P., Binda, M., Swinnen, E., De Virgilio, C., and Winderickx, J. (2010). Life in the midst of scarcity: Adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* *56*, 1–32.

- Soifer, I., and Barkai, N. (2014). Systematic identification of cell size regulators in budding yeast. *Mol. Syst. Biol.* *10*, 761.
- Sompayrac, L., and Maaløe, O. (1973). Autorepressor Model for Control of DNA Replication. *Nature* *241*, 133–135.
- Son, S., Tzur, A., Weng, Y., Jorgensen, P., Kim, J., Kirschner, M.W., and Manalis, S.R. (2012). Direct observation of mammalian cell growth and size regulation. *Nat. Methods* *9*, 910–912.
- Sorenson, A., De, S., Kishony, R., and Michor, F. (2015). Polyploidy can drive rapid adaptation in yeast. *Nature.Com* *519*, 349–352.
- Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D., and Futcher, B. (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell* *9*, 3273–3297.
- Stein, G.S., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., and Lian, J.B. (1992). Regulation of histone gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* *4*, 166–173.
- Storchova, Z., and Pellman, D. (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 45–54.
- Stuart, D., and Wittenberg, C. (1995). CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells. *Gene. Dev.* *9*, 2780–2794.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 15545–15550.
- Sudbery, P.E., Goodey, A.R., and Carter, B.L. (1980). Genes which control cell proliferation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *288*, 401–404.
- Sveiczer, A., Novak, B., and Mitchison, J.M. (1996). The size control of fission yeast revisited. *J. Cell Sci.* *2957*, 2947–2957.
- Tagawa, A., Mezzacasa, A., Hayer, A., Longatti, A., Pelkmans, L., and Helenius, A. (2005). Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *170*, 769–779.
- Takagi, A., Harashima, S., and Oshima, Y. (1983). Construction and characterization of isogenic series of *Saccharomyces cerevisiae* polyploid strains. *Appl. Environ. Microbiol.* *45*, 1034–1041.
- Talia, S. Di, Skotheim, J.M., Bean, J.M., Siggia, E.D., Cross, F.R., and Di Talia, S. (2007). The effects of molecular noise and size control on variability in the budding yeast cell cycle. *Nature* *448*, 947–951.
- Di Talia, S., Wang, H., Skotheim, J.M., Rosebrock, A.P., Futcher, B., and Cross, F.R. (2009). Daughter-specific transcription factors regulate cell size control in budding yeast. *PLoS Biol.* *7*.
- Thompson, D.W. (1961). On growth and form.

- Truman, A.W., Kristjansdottir, K., Wolfgeher, D., Hasin, N., Polier, S., Zhang, H., Perrett, S., Prodromou, C., Jones, G.W., and Kron, S.J. (2012). CDK-Dependent Hsp70 phosphorylation controls G1 cyclin abundance and cell-cycle progression. *Cell* 151, 1308–1318.
- Tsukaya, H. (2008). Controlling size in multicellular organs: Focus on the leaf. *PLoS Biol.* 6, 1373–1376.
- Tsukaya, H. (2013). Does ploidy level directly control cell size? Counterevidence from Arabidopsis genetics. *PLoS One* 8, e83729.
- Turner, J.J., Ewald, J.C., and Skotheim, J.M. (2012). Cell size control in yeast. *Curr. Biol.* 22, R350–R359.
- Tyers, M., Tokiwa, G., Nash, R., and Futcher, B. (1992). The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *EMBO J.* 11, 1773–1784.
- Tyers, M., Tokiwa, G., and Futcher, B. (1993). Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J.* 12, 1955–1968.
- Tyson, C.B., Lord, P.G., and Wheals, A.E. (1979). Dependency of size of *Saccharomyces cerevisiae* cells on growth rate. *J. Bacteriol.* 138, 92–98.
- Tzur, A., Kafri, R., LeBleu, V.S., Lahav, G., and Kirschner, M.W. (2009). Cell growth and size homeostasis in proliferating animal cells. *Science* 325, 167–171.
- Vergés, E., Colomina, N., Garí, E., Gallego, C., and Aldea, M. (2007). Cyclin Cln3 Is Retained at the ER and Released by the J Chaperone Ydj1 in Late G1 to Trigger Cell Cycle Entry. *Mol. Cell* 26, 649–662.
- Verghese, J., Abrams, J., Wang, Y., and Morano, K.A. (2012). Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 115–158.
- Wang, H., Garí, E., Vergés, E., Gallego, C., and Aldea, M. (2004). Recruitment of Cdc28 by Whi3 restricts nuclear accumulation of the G1 cyclin-Cdk complex to late G1. *EMBO J.* 23, 180–190.
- Wang, H., Carey, L.B., Cai, Y., Wijnen, H., and Futcher, B. (2009). Recruitment of Cln3 cyclin to promoters controls cell cycle entry via histone deacetylase and other targets. *PLoS Biol.* 7.
- Warner, J.R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 24, 437–440.
- Weiss, E.L., Kurischko, C., Zhang, C., Shokat, K., Drubin, D.G., and Luca, F.C. (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* Mob2p-Cbk1p kinase complex promotes polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate daughter cell-specific localization of Ace2p transcription factor. *J. Cell Biol.* 158, 885–900.
- Wijnen, H., Landman, A., and Futcher, B. (2002). The G(1) cyclin Cln3 promotes cell cycle entry via the transcription factor Swi6. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4402–4418.
- Wilson, E. (1925). *The cell in development and heredity.* (New York: Macmillan).

- Wu, W.-S., and Li, W.-H. (2008). Identifying gene regulatory modules of heat shock response in yeast. *BMC Genomics* 9, 439.
- Wu, C.Y., Alexander Rolfe, P., Gifford, D.K., and Fink, G.R. (2010). Control of transcription by cell size. *PLoS Biol.* 8.
- Xie, Z.X., Mitchell, L.A., Liu, H.M., Li, B.Z., Liu, D., Agmon, N., Wu, Y., Li, X., Zhou, X., Li, B., et al. (2018). Rapid and efficient CRISPR/Cas9-based mating-type switching of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 8, 173–183.
- Xiong, Y., Connolly, T., Futcher, B., and Beach, D. (1991). Human D-type cyclin. *Cell* 65, 691–699.
- Yahya, G., Parisi, E., Flores, A., Gallego, C., and Aldea, M. (2014). A Whi7-Anchored Loop Controls the G1 Cdk-Cyclin Complex at Start. *Mol. Cell* 53, 115–126.
- Yang, H.C., and Pon, L.A. (2002). Actin cable dynamics in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 751–756.
- Zaritsky, A., Vischer, N., and Rabinovitch, A. (2007). Changes of initiation mass and cell dimensions by the “eclipse.” *Mol. Microbiol.* 63, 15–21.
- Zhang, J., Schneider, C., Ottmers, L., Rodriguez, R., Day, A., Markwardt, J., and Schneider, B.L. (2002). Genomic scale mutant hunt identifies cell size homeostasis genes in *S. cerevisiae*. *Curr. Biol.* 12, 1992–2001.