



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



Universidad de Salamanca

Departamento de Microbiología y Genética

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

ESTUDIO DE LAS FOSFATASAS hCdc14 EN EL CICLO DE DIVISIÓN CELULAR Y EN LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL DNA

Tesis Doctoral

Patricia Ayala de la Roca

Salamanca, 2015

Director:

Dra. María P. Sacristán Martín



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
DEL CÁNCER

Dña. María de la Paz Sacristán Martín, Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “**Estudio de las Fosfatasas hCdc14 en el Ciclo de División Celular y en la Respuesta al Daño en el DNA**” presentada por la Licenciada en Biología **PATRICIA AYALA DE LA ROCA**, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, USAL/CSIC, y que reúne a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste a efectos legales, expiden el presente certificado en Salamanca a de Enero de 2015.

Fdo. María de la Paz Sacristán Martín

Este proyecto de Tesis ha sido financiado por:

- El Programa JAEPredctoral del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (beca concedida para el período 2010-2014)
- El Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2008-04293, BFU2012-307879)
- La Fundación Samuel Solórzano Barroso (FS/15-2012)

ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN	23
CICLO DE DIVISIÓN CELULAR Y SU REGULACIÓN	25
I. CICLO DE DIVISIÓN CELULAR	25
II. REGULACIÓN DEL CICLO DE DIVISIÓN CELULAR	26
1. Complejos CDK-ciclina.....	26
2. Puntos de control del ciclo celular: Checkpoints	28
MITOSIS Y SU REGULACIÓN	29
I. MITOSIS	29
II. REGULACIÓN DE LA ENTRADA EN MITOSIS	29
1. Regulación de los complejos CDK mitóticos en la transición G2/M	29
2. Regulación de la entrada en mitosis por otras quinasas	32
2.1 Quinasas de la familia Polo	32
2.2 Quinasas de la familia Aurora	32
2.3 Quinasas de la familia NIMA	34
2.3 Greatwall.....	34
III. REGULACIÓN DE LA SALIDA DE MITOSIS.....	34
1. Degradación proteica mediada por el complejo APC/C	35
2. Desfosforilación de sustratos a la salida de mitosis	36
2.1 Fosfatasas PP2A.....	37
2.2 Fosfatasas PP1	37
2.3 Fosfatasa Fcp1	39
2.3 Fosfatasas Cdc14.....	39
FOSFATASAS DE LA FAMILIA Cdc14	39
1. Cdc14 en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
2. Cdc14 en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	41
3. Fosfatasas Cdc14 en células humanas	42

3.1 hCdc14A.....	42
3.2 hCdc14B.....	44
PUNTOS DE CONTROL O CHECKPOINTS	47
I. CHECKPOINT DEL ENSAMBLAJE DEL HUSO MITÓTICO.....	47
II. CHECKPOINT DE DAÑO EN EL DNA	51
1. Activación del <i>checkpoint</i>	52
1.1 Activación de las proteínas sensoras.....	52
1.2 Reclutamiento de las proteínas mediadoras.....	53
1.3 Activación de las proteínas transductoras.....	54
1.4 Función de las proteínas efectoras	55
2. Mantenimiento del <i>checkpoint</i>	56
3. Silenciamiento del <i>checkpoint</i>	57
4. Adaptación del <i>checkpoint</i>	57
REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL DNA.....	58
I. REPARACIÓN POR UNIÓN DE EXTREMOS NO HOMÓLOGOS	59
II. REPARACIÓN POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.....	60
1. Mecanismo de reparación por HR	60
2. Regulación de las proteínas participantes en la HR por fosforilación por CDK....	64
FUNCIÓN DE LAS FOSFATASAS EN LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL DNA	64
OBJETIVOS.....	67
RESULTADOS.....	71
I. hCdc14A COMO POSIBLE FOSFATASA IMPLICADA EN LA SALIDA DE MITOSIS	73
1. Análisis de la cinética de salida de mitosis en células carentes de hCdc14A	74
2. Análisis de la segregación cromosómica en células deficientes en hCdc14A	78

3. Análisis proteómico de fosfoproteínas mitóticas como sustratos potenciales de hCdc14A.....	81
3.1 RepoMan como potencial sustrato de hCdc14A	83
3.2 RepoMan como sustrato de fosfatasas de la superfamilia PPP	88
II. PARTICIPACIÓN DE hCdc14B EN LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL DNA	91
1. Análisis de la localización subcelular de hCdc14B frente a diferentes tipos de estrés.....	92
2. Análisis de la posible implicación de hCdc14B en la respuesta al daño en el DNA	93
3. Implicación de hCdc14B en la viabilidad celular tras el tratamiento con el agente genotóxico doxorubicina	100
4. Estudio de la implicación de hCdc14B en los procesos de reparación	103
DISCUSIÓN.....	109
I. hCdc14A Y SU POSIBLE IMPLICACIÓN EN PROCESOS MITÓTICOS.....	111
II. PARTICIPACIÓN DE hCdc14B EN LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL DNA	118
CONCLUSIONES.....	125
MATERIALES Y MÉTODOS	129
I. CULTIVO Y TRANSFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES HUMANAS.....	131
1. Líneas celulares empleadas.....	131
2. Métodos y condiciones de cultivo	132
3. Congelación y descongelación de las células.....	132
4. Sincronización de cultivos celulares	133
4.1 Sincronización de las células en G1/S mediante doble tratamiento con timidina.....	133
4.2 Sincronización de las células en G1/S mediante el tratamiento con nocodazol	133

5. Tratamiento de las células con otros reactivos	134
6. Transfección de las células	134
6.1 Transfección con DNA plasmídico	134
6.1.1 Método del fosfato cálcico	134
6.1.2 Lipofección.....	134
6.1.3 Electroporación.....	135
6.2 Transfección con RNAs de interferencia.....	135
7. Infección de las células	136
7.1 Generación de las líneas celulares inducibles mediante infección con retrovirus	136
7.1.1 Elementos del sistema Retro-X-Tet-On Advanced.....	136
7.1.2 Establecimiento del sistema inducible en líneas celulares.....	138
7.2 Delección génica condicional de hCdc14A en células RPE hCdc14 ^{-flox}	138
II. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	139
1. Construcción de plásmidos de DNA recombinante.....	139
1.1 Amplificación de DNA mediante PCR	139
1.2 Digestión del DNA mediante enzimas de restricción	140
1.3 Electroforesis de fragmentos de DNA en geles de agarosa	140
1.4 Purificación y ligación de fragmentos de DNA	140
1.5 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	141
1.6 Aislamiento de DNA plasmídico a partir de <i>Escherichia coli</i>	141
1.7 Determinación de la concentración de ácidos nucleicos	141
1.8 Secuenciación del DNA.....	141
2. Análisis de mRNA	141
III. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	142
1. Obtención de extractos proteicos totales	142
2. Valoración de la concentración de proteínas	142

3. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.....	143
4. Análisis de proteínas mediante <i>Western Blot</i>	143
IV. INMUNOPRECIPITACIÓN.....	145
V. ANÁLISIS PROTEÓMICOS	145
VI. INMUNOCITOQUÍMICA Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	145
VII. ANÁLISIS DE LOS SISTEMAS DE REPARACIÓN DE ROTURAS DE DOBLE CADENA EN EL DNA	147
1. Descripción de los plásmidos de análisis de los sistemas de reparación HR y NHEJ	147
2. Linealización de los plásmidos de HR y NHEJ mediante digestión con endonucleasas	148
3. Transfección	148
4. Análisis de mediante citometría de flujo.....	148
VIII. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	149
1. Análisis del ciclo celular	149
2. Análisis de emisión de fluorescencia para determinar la eficiencia de reparación.....	149
IX. ENSAYOS DE MUERTE CELULAR	150
BIBLIOGRAFÍA.....	151
AGRADECIMIENTOS.....	171

ABREVIATURAS

- 53BP1:** *p53 Binding Protein*, proteína de unión a p53.
- AdCre:** adenovirus portadores de la Cre recombinasa.
- APC/C:** *Anaphase Promoting Complex/Ciclosome*, complejo promotor de anafase/ciclosoma.
- Arpp19:** *Adenosine monophosphate-regulated phosphoprotein 19*, fosfoproteína regulada por adenosina monofosfato 19.
- Ase1:** *Anaphase Spindle Elongation*, proteína de elongación del huso en anafase.
- ATM:** *Ataxia Teleangiectasia Mutated kinase*, quinasa mutada en el síndrome *Ataxia Teleangiectasia*.
- ATR:** *ATM-and Rad53-related kinase*, quinasa relacionada con ATM y Rad53.
- ATP:** *Adenosine triphosphate*, adenosín trifosfato.
- BRCA:** *BReast Cancer Associated*, proteína asociada al cáncer de mama.
- BSA:** *Bovine Serum Albumin*, albúmina de suero bovino.
- BUB:** *Budding uninhibited by benzimidazoles*, proteína del *checkpoint* del ensamblaje del huso mitótico.
- CAK:** *CDK Activating Kinase*, quinasa activadora de CDK.
- CAPS:** ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico.
- CD:** *Carboxyl Domain*, dominio carboxilo.
- Cdc:** *Cell division cycle*, ciclo de división celular.
- CDCA2:** *Cell Division Cycle Associated protein 2*, proteína asociada al ciclo de división celular.
- cDNA:** *Complementary Deoxyribonucleic Acid*, ácido desoxirribonucleico complementario.
- CDK:** *Cyclin Dependent Kinase*, quinasa dependiente de ciclina.
- Chk:** *Checkpoint kinase*, quinasa de checkpoint.
- CHX:** *Cycloheximide*, cicloheximida, inhibidor de la síntesis de proteínas.
- Cip/Kip:** *CDK Interactin Protein/Kinase Inhibitor Protein*, proteína de interacción con CDK/proteína inhibidora de quinasa.
- CKI:** *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor*, inhibidor de CDKs.
- CLS:** *Cytoplasmic Localization Signal*, señal de localización citoplasmática.
- CPC:** *Chromosomal Passenger Complex*.
- CRS:** *Cytoplasmic Retention Signal*, señal de retención citoplasmática.
- CTD:** *Carboxy Terminal Domain*, dominio carboxilo terminal.
- DAPI:** *4,6-diamidine-2-phenylindole*, diamino-fenilindol.
- DDR:** *DNA Damage Response*, respuesta a daño en el DNA.
- DEB:** *Diepoxybutane*, Diepoxibutano.
- DES:** *Diethyl Sulfate*, dietil sulfato.
- DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, medio de cultivo.

DMSO: *Dimethyl Sulfoxide*, dimetilsulfóxido.

DNA: *Deoxyribonucleic Acid*, Ácido desoxirribonucleico.

DNA-PK: *DNA Protein Kinase*, proteína quinasa del DNA.

dNTPs: *Deosynucleoside Triphosphate*, desoxinucleósidos trifosfato.

DSB: *Double Strand Break*, rotura de doble cadena del DNA.

DTT: *Dithiothreitol*, ditiotreitól.

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*, ácido etilen-diamino-tetraacético.

Ensa: *α -Endosulfine*, α -Endosulfina.

FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorting*, citometría de flujo.

FBS: *Foetal Bovine Serum*, suero bovino fetal.

FEAR: *Fourteen Early Anaphase Release*, ruta de liberación de Cdc14 en anafase temprana en *S. cerevisiae*.

Fin1: *Filaments Inbetween Nuclei 1*, filamentos internucleares 1.

Flp1/Cip1: *Fourteen-like phosphatase 1/Cdc-Fourteen-like protein 1*, fosfatasa homóloga de Cdc14 en *S. pombe*.

FNIP1: *Folliculin Interacting Protein 1*, proteína de interacción con foliculina 1.

GFP: *Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente.

GIMAP5: *GTPase IMAP family member 5*, miembro 5 de la familia de GTPasas IMAP.

G1, G2: *Gap1, Gap2*, fases del ciclo celular.

Gwl: *Greatwall*, quinasa Greatwall.

HCT116: *Human colon cancer*, línea celular de cáncer de colon.

HEK: *Human Embryonic Kidney*, línea celular de riñón embrionario humano.

HeLa: *Henrietta Lacks*, línea celular de cáncer cérvico-uterino.

HU: *Hydroxyurea*, hidroxiiurea.

HP1: *Heterochromatin Protein 1*. Proteína de la heterocromatina 1.

HR: *Homologous Recombination*, recombinación homóloga.

hTERT-RPE: *human Telomerase Reverse Transcriptase-immortalized Retinal Pigment Epithelial*, células de epitelio pigmentario de retina humana inmortalizadas por sobreexpresión de la telomerasa.

INK4: *Inhibitor of CDK4*, inhibidor de CDK4.

IP: inmunoprecipitados.

Kb: kilobase.

kDa: kilodalton.

KIBRA: *Kidney- and Brain-expressed protein*, proteína expresada en riñón y cerebro.

KO: *Knock Out*, que carecen del gen al que se haga referencia.

M: *Mitosis*, fase del ciclo de división celular.

M: molar

mA: miliamperio.

MAD: *Mitotic arrest deficient*, proteína del *checkpoint* del ensamblaje del huso.

MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*.

MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinases*, quinasas activadas por mitógenos

MAST-L: *Microtubule-associated serine/threonine kinase-like protein*, proteína parecida a la serina/treonina quinasa asociada a microtúbulos.

MDC1: *Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1*, mediador del *checkpoint* de daño en el DNA 1.

MEFs: *Mouse Embryonic Fibroblasts*, fibroblastos embrionarios de ratón.

MEN: *Mitosis Exit Network*, ruta de salida de mitosis en *S. cerevisiae*.

MKLP2: *Mitotic kinesin-like protein 2*, proteína similar a quinesina mitótica 2.

MMS: *Methyl metanesulfonate*, metilmetanosulfonato.

MRN: *Mre11-Rad50-Nbs1*.

mRNA: *messenger Ribonucleic Acid*, RNA mensajero.

µg: microgramo

mg: miligramo

µl: microlitro

ml: mililitro

µM: micromolar

mM: milimolar

NADC: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide-dependent Deacetylase*, desacetilasa dependiente de NAD.

ND: dominio amino.

NEBD: *Nuclear Envelope Breakdown*, rotura de la envuelta nuclear.

NES: *Nuclear Export Signal*, señal de exportación nuclear.

ng: nanogramo.

NHEJ: *Non Homologous End Joining*, unión de extremos no homólogos.

NIMA: *Never In Mitosis A*, nunca en mitosis A, familia de quinasas.

NLS: *Nuclear Localization Signal*, señal de localización nuclear.

nm: nanómetro.

NoLS: *Nucleolar Localization Sequence* o secuencia de localización nucleolar.

NZ: *nocodazole*, nocodazol.

OA: *Okadaic acid*, ácido okadaico.

- PAK2:** *p21 Activated Kinase*, quinasa activada por p21.
- PBS:** tampón fosfato salino.
- PCR:** *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa.
- PD:** *Phosphatase Dead*, forma inactiva de la fosfatasa.
- pH:** $\log_{10}[\text{H}^+]$.
- PLK:** *Polo like kinase*, quinasa de la familia Polo.
- PMSF:** *phenylmethylsulfonyl fluoride*, fluoruro de fenil-sulfonil.
- PPP:** *Phosphoprotein Phosphatases*, superfamilia de fosfatasas Ser/Thr.
- PTP:** *Protein Tyrosine Phosphatases*, proteínas tirosina fosfatasas.
- Purv:** *purvalanol A*, purvalanol A.
- PUS3:** *tRNA PseudoUridine Synthase*, tRNA pseudouridina sintasa.
- RAD:** *RADiation sensitive*, proteína sensible a la radiación.
- rDNA:** *ribosomal Deoxyribonucleic Acid*, DNA ribosomal.
- r.p.m.:** *revolutions per minute*, revoluciones por minuto.
- RPMI:** *Roswell Park Memorial Institute medium*, medio de cultivo.
- RNA:** *Ribonucleic Acid*, Ácido ribonucleico.
- ROS:** *Reactive Oxygen Species*, especies reactivas de oxígeno.
- RPA:** *Replication Protein A*, proteína de replicación A.
- RT-qPCR:** *Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction*, PCR cuantitativa en tiempo real.
- S, Ser:** *serine*, serina.
- S:** *Synthesis*, fase S, fase de síntesis
- SAC:** *Spindle Assembly Checkpoint*, punto de control del ensamblaje del huso mitótico.
- SCF:** *SKP1/Cul1/E-box*
- SCF^{βTrCP}:** *SCF-box β-Transducin repeat-Containing Protein*, complejo ubiquitín ligase.
- SDS:** *sodium dodecyl sulphate*, dodecil sulfato sódico.
- SDS-PAGE:** *SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*, gel de electroforesis de SDS poliacrilamida.
- shRNA:** *short hairpin Ribonucleic Acid*, RNA de horquillas cortas.
- SIN:** *Septation Initiation Network*, ruta de inicio de la septación o citoquinesis en *S. pombe*.
- siRNA:** *small interfering Ribonucleic Acid*, RNA pequeño de interferencia.
- SPB:** *Spindle Pole Body*, cuerpo polar del huso, análogo del centrosoma en células humanas.
- SPB7:** *SerpinB7*, serpina B7.
- ssDNA:** *single-stranded DNA*, DNA de cadena sencilla.
- T, Tet:** *tetracycline*, tetraciclina.

Thr, T: *threonine*, treonina.

TAE: *tris acetate-EDTA*, tris Acetato-EDTA.

Thy, Thym: *thymidine*, timidina.

Tris: *hydroxymethyl aminomethane*, hidroximetil aminometano.

OA: *Okadaic Acid*, ácido okadaico.

U2OS: *U2-osteosarcoma*, línea celular de osteosarcoma.

V: *volt*, voltio.

wt: *wild type*, tipo silvestre.

Y, Tyr: *tyrosine*, tirosina.

INTRODUCCIÓN

CICLO DE DIVISIÓN CELULAR Y SU REGULACIÓN

I. CICLO DE DIVISIÓN CELULAR

La función del ciclo de división celular es duplicar con exactitud el DNA generando dos copias idénticas del material genético y segregar las copias con precisión en dos células hijas genéticamente idénticas. Estos procesos definen las dos fases principales del ciclo celular, la fase S o de síntesis y la fase M, mitosis. Durante la fase S tiene lugar la replicación del DNA generando dos copias idénticas del material genético. Este período ocupa alrededor de la mitad del tiempo que dura el ciclo celular en una célula de mamífero. Después de la fase S, la segregación de los cromosomas o división nuclear ocurre en la fase M, seguido de la división celular o citoquinesis. La mitosis es un proceso muy rápido, se lleva a cabo en menos de una hora en una célula de mamífero, pero resulta especialmente importante ya que, al igual que en la fase S, alteraciones en esta fase del ciclo pueden conducir a aneuploidías e inestabilidad genómica. Entre ambas fases principales se distinguen dos fases denominadas G1 y G2 (*Gap phases*). La fase G1 entre la fase M y la fase S, y la fase G2 entre la fase S y la fase M. Durante estos períodos se produce crecimiento celular, síntesis de proteínas y de RNA y además, la célula comprueba que los procesos ocurridos en la fase anterior se hayan producido adecuadamente, en cuyo caso ocurre la transición a la siguiente fase del ciclo, de ahí la importancia de las transiciones G1/S y G2/M. Al conjunto de las fases G1, S y G2 se le denomina interfase (Figura I-1). A lo largo del ciclo celular, debe existir una precisa coordinación entre el crecimiento celular, la replicación del DNA y la segregación de este material genético, la cual se consigue mediante diferentes mecanismos de control.

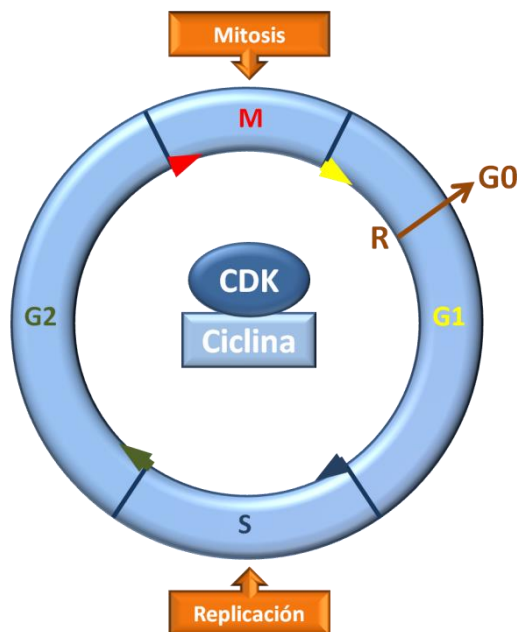


Figura I-1. El ciclo celular. El ciclo celular está formado por las fases secuenciales G1, S, G2 y M. En la figura se muestra el punto de restricción o *Start* en el que las células pueden entrar en estado de quiescencia (G0). Las flechas señalan las transiciones entre las distintas fases. En el centro se representan los complejos CDK-ciclina, cuya actividad regula la progresión por las diferentes fases del ciclo celular.

II. REGULACIÓN DEL CICLO DE DIVISIÓN CELULAR

El ciclo de división celular debe estar perfectamente regulado ya que alteraciones en el mismo conducen a proliferación incontrolada e inestabilidad genómica que llevan al desarrollo de diferentes enfermedades. La precisa regulación del ciclo celular es llevada a cabo principalmente por los complejos CDK-ciclina. Los complejos CDK son claves en la regulación de la progresión por el ciclo celular, de modo que la desregulación de su actividad tiene como consecuencia diferentes defectos en el ciclo celular como proliferación incontrolada, inestabilidad genómica e inestabilidad cromosómica que contribuyen, entre otras cosas, a la transformación tumoral (Malumbres and Barbacid, 2009).

La correcta progresión por el ciclo celular también está controlada por los *checkpoints* o puntos de control, los cuales detectan posibles errores durante diferentes procesos como la síntesis de DNA y la segregación cromosómica, o daños en el material genético producidos en las diferentes fases del ciclo. La activación de estos puntos de control conduce al arresto del ciclo celular mediante regulación de la actividad CDK, de modo que esta parada del ciclo permite a las células reparar correctamente estos defectos previniendo su transmisión a las células hijas (Malumbres and Barbacid, 2009).

1. Complejos CDK-ciclina

En las células eucariotas, la progresión por el ciclo celular está controlada principalmente por los complejos formados por las quinasas CDKs (*Cyclin Dependent Kinases*) y sus respectivas ciclinas. Las CDKs fosforilan numerosos sustratos en residuos de serina o treonina y están conservadas evolutivamente desde levaduras hasta metazoa.

En levaduras existe una única Cdk, denominada Cdc28 en *Saccharomyces cerevisiae* (Reed et al., 1982; Reed et al., 1985) o Cdc2 en *Schizosaccharomyces pombe* (Simanis and Nurse, 1986), la cual regula la progresión por las distintas fases del ciclo.

En células de mamífero existen varias CDKs de las cuales cuatro de ellas están implicadas en la regulación del ciclo celular. **CDK4** y **CDK6** están implicadas en la regulación de la progresión por G1, **CDK2** regula principalmente la entrada y progresión por la fase S y **CDK1** es necesaria para la entrada y progresión por mitosis (Lees, 1995; Morgan, 1995). Estudios en ratones *knockout* (KO) muestran que CDK2, CDK4 y CDK6 no son esenciales para la progresión por el ciclo celular en la mayoría de los tipos celulares. Sin embargo, la falta de cada una de ellas sí que produce defectos específicos en algunos tipos celulares especializados. Solo CDK1 parece esencial para la regulación del ciclo celular ya que su falta impide el desarrollo embrionario desde el estadio de dos células (Malumbres and Barbacid, 2009; Santamaria et al., 2007).

Los niveles proteicos de estas quinasas no varían a lo largo del ciclo celular, sin embargo, su actividad sí que fluctúa a lo largo del ciclo. Debido a su importante papel en el control de la progresión por el ciclo celular, la actividad de estos complejos está estrictamente regulada por diversos mecanismos como su asociación a proteínas activadoras, ciclinas, que además les confieren especificidad de sustrato, por su unión a proteínas inhibidoras CKIs (*CDK Kinase Inhibitors*) y por procesos de fosforilación/desfosforilación.

Las ciclinas son proteínas cuyos niveles varían durante el ciclo celular, debido a la regulación tanto de su transcripción como de su degradación. Existen ciclinas en todos los organismos eucariotas estudiados, aunque su conservación evolutiva no es muy grande, estando limitada a la región de interacción con las CDKs (Kobayashi et al., 1992; Lees and Harlow, 1993). En células de mamífero se han identificado cuatro clases de ciclinas, cada una de ellas definida por la etapa del ciclo celular en la que se unen a su respectiva CDK. Entre ellas se encuentran:

- Ciclinas de G1: Aparecen en G1 y promueven la entrada en un nuevo ciclo celular. Son las **Ciclinas D (D1, D2, D3)**, que se asocian a *CDK4* y *CDK6* durante G1.
- Ciclinas de G1/S: Aparecen en G1/S y son necesarias para el inicio de la replicación del DNA. En este caso, la **Ciclina E** se asocia a *CDK2*.
- Ciclinas de fase S: Permiten la progresión por la fase S. La **Ciclina A** se asocia a *CDK2* durante esta fase.
- Ciclinas mitóticas: Son indispensables para la entrada y progresión por mitosis. Esta función la desempeñan inicialmente la **Ciclina A** y sobre todo las **Ciclinas B (B1, B2, B3)**, que forman complejos con *CDK1*.

La actividad de estos complejos también está regulada por su unión a inhibidores CKI, entre los que destacan:

- Inhibidores de la familia INK4 (*Inhibitor of CDK4*): formada por p16, p15, p18 y p19. Se unen a *CDK4* y *CDK6* impidiendo su asociación con las Ciclinas D (Sherr and Roberts, 1999).
- Inhibidores de la familia Cip/Kip (*CDK Interactin Protein/Kinase Inhibitor Protein*): formada por p21, p27 y p57. Inhiben a los complejos CDK para frenar la proliferación durante el desarrollo, la diferenciación y la respuesta frente a estrés celular (Besson et al., 2008; Malumbres and Barbacid, 2005).

Las fluctuaciones en la actividad CDK no solo dependen de la formación de los complejos CDK-ciclina o de su asociación a proteínas inhibidoras, sino también de procesos de fosforilación y desfosforilación que se describen en secciones posteriores.

2. Puntos de control del ciclo celular: *Checkpoints*

Los puntos de control del ciclo celular o *checkpoints* se activan cuando se detectan alteraciones en la célula en diversos procesos como la replicación del DNA, la segregación cromosómica o cuando se produce daño en el material genético, con el fin de regular la actividad de los complejos CDK y producir la parada del ciclo permitiendo a las células reparar correctamente estos defectos. Existen diferentes *checkpoints* que regulan diferentes procesos celulares, pero los mecanismos más estudiados se pueden clasificar en tres tipos principales:

- **Checkpoint de daño en el DNA.** Se activa cuando se detectan roturas o alteraciones de la estructura normal de la cadena de DNA con el fin de parar el ciclo celular en la fase que se ha producido el daño y, si el daño no es muy extenso, repararlo. El daño en el DNA puede ocurrir en cualquier fase del ciclo celular. Por lo tanto, el *checkpoint* de daño según cuando se active puede provocar la parada del ciclo celular en G1/S para evitar la replicación del DNA dañado, dentro de la fase S cuando el daño se produce mientras se replica el DNA o en G2/M para prevenir la segregación de los cromosomas que presentan daño en el DNA (Kastan and Bartek, 2004).
- **Checkpoint de replicación.** Se activa cuando el proceso de replicación del DNA se bloquea, bien por alteraciones en la estructura del DNA producidas por agentes externos o bien por el propio mecanismo de replicación que puede generar errores en el proceso de incorporación de los nucleótidos, que resulten en una parada de las horquillas de replicación. Su activación va dirigida a retrasar tanto la progresión de las células por la fase S del ciclo celular, manteniendo la estabilidad de la horquilla de replicación y de todos sus elementos para poder reanudar de nuevo el proceso replicativo una vez haya desaparecido el elemento perturbador, como a inhibir la entrada en mitosis de las células hasta que todo el material genético se haya replicado y pueda ser repartido equitativamente entre las dos células hijas (Costanzo et al., 2003; Donzelli and Draetta, 2003).
- **Checkpoint del ensamblaje del huso mitótico (SAC, Spindle Assembly Checkpoint).** Se activa desde el inicio de la mitosis, debido a la presencia de cinetocoros no unidos a microtúbulos o unidos de forma incorrecta, y su función es inhibir la entrada en anafase hasta que todos los cromosomas estén unidos de forma bipolar al huso mitótico, asegurando la correcta segregación cromosómica y evitando así la aparición de aneuploidías (Baker et al., 2005; Musacchio and Salmon, 2007).

Tanto el *checkpoint* de daño en el DNA como el *checkpoint* del ensamblaje del huso mitótico están implicados en el estudio en esta tesis por lo que se describirán con más detalle en secciones posteriores.

MITOSIS Y SU REGULACIÓN

I. MITOSIS

La mitosis constituye una de las fases más críticas del ciclo celular cuya función es la correcta segregación cromosómica para dar lugar a dos células hijas idénticas genéticamente. Se divide en 5 fases denominadas profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. Durante la profase se produce la condensación de la cromatina para constituir los cromosomas y finaliza con la ruptura de la envuelta nuclear. En la prometafase la envuelta nuclear se ha desorganizado y las cromátidas hermanas se unen mediante sus cinetocoros a los microtúbulos procedentes de polos opuestos del huso mitótico dando lugar a uniones bipolares estables, y alineándose en el plano ecuatorial de las células formando la placa metafásica, durante la metafase. A continuación, durante la anafase, las cromátidas hermanas se separan migrando hacia los dos polos opuestos del huso mitótico. Por último, en telofase, se descondensan las cromátidas, se desensambla el huso mitótico y se reorganiza la envuelta nuclear.

La progresión por todas estas fases mitóticas está mediada fundamentalmente por procesos de fosforilación, desfosforilación y degradación de proteínas.

II. REGULACIÓN DE LA ENTRADA EN MITOSIS

La entrada en mitosis es un momento crítico en el ciclo celular en el que la célula debe asegurarse de que las fases previas, replicación del DNA y crecimiento celular, se hayan llevado a cabo correctamente. Esta transición G2/M precisa de un estricto control en el que participan numerosas proteínas, entre las que destacan los complejos CDK mitóticos, cuya actividad está estrictamente regulada a través de varios mecanismos.

1. Regulación de los complejos CDK mitóticos en la transición G2/M

Los complejos CDK-ciclina mitóticos tienen como subunidad catalítica a CDK1, que se asocia inicialmente a la ciclina A y después a las ciclinas B, entre las cuales la función de la ciclina B1 es especialmente importante.

En primer lugar, los complejos CDK1-ciclina A son necesarios para que tenga lugar la transición G2/M hasta la entrada de la ciclina B1 al núcleo al final de profase (Pines and Rieder, 2001). Participan en la regulación de procesos tempranos como la condensación cromosómica y la acumulación de ciclina B1 en el núcleo (Gong et al., 2007).

Los complejos CDK1-ciclina B1 tienen un papel esencial en el control de la entrada en mitosis y progresión por las fases iniciales de la misma. La regulación de su actividad se produce a través de dos mecanismos principales. Por un lado, los complejos CDK1-ciclina B1

son regulados mediante el control de los niveles proteicos de ciclina B1, de tal forma que una regulación combinada de transcripción y degradación de la proteína asegura que altos niveles de ciclina B1 estén limitados a G2 y las etapas tempranas de la mitosis (Acquaviva and Pines, 2006; van Leuken et al., 2008). También es importante la regulación de su localización subcelular mediada por fosforilación en la CRS (*Cytoplasmic Retention Sequence*) al inicio de mitosis (Hagting et al., 1998), lo que favorece la entrada de los complejos CDK1-ciclina B1, inicialmente activados en los centrosomas, al núcleo donde ejercen su función sobre numerosos sustratos.

En segundo lugar, la actividad de los complejos CDK1-ciclina B1 se regula a través de procesos de fosforilación/desfosforilación en residuos concretos. Esta activación requiere en primer lugar de la fosforilación del residuo Thr¹⁶¹ por el complejo CAK (*CDK Activating Kinase*) (Lolli and Johnson, 2005). Estos complejos CDK1-ciclina B1, aunque comienzan a acumularse durante fase S, permanecen inhibidos debido a las fosforilaciones en los residuos Thr¹⁴ y Tyr¹⁵ por las quinasas Wee1, que fosforila el residuo Tyr¹⁵, y Myt1, capaz de fosforilar ambos residuos pero con preferencia por Thr¹⁴ (Liu et al., 1997; Mueller et al., 1995). Estas fosforilaciones son eliminadas por las fosfatasa hCdc25 permitiendo la activación de estos complejos (De Souza et al., 2000; Jackman et al., 2003) (Figura I-2). hCdc25B inicia la activación de CDK1-ciclina B1 en los centrosomas (Lindqvist et al., 2005), activación que es completada por hCdc25C en el núcleo durante las primeras fases de mitosis (Dalal et al., 1999). hCdc25A también está implicada en la activación de los complejos CDK1-ciclina B1 a la entrada en mitosis (Lindqvist et al., 2005). Los complejos CDK1-ciclina B1 autoamplifican su propia actividad mediante un mecanismo de retroalimentación positiva (Figura I-2). Una vez activos, estos fosforilan a Wee1 y Myt1 promoviendo su inactivación, en el caso de Myt1 (Nakajima et al., 2003), o su degradación, en el caso de Wee1 (Watanabe et al., 2004). De igual modo, estos complejos fosforilan y activan a hCdc25C, estabilizan a hCdc25A y regulan la localización y actividad de hCdc25B (Baldin et al., 2003; Boutros et al., 2006; Mailand et al., 2002b).

Existen además mecanismos que impiden una entrada prematura en mitosis inhibiendo la activación de los complejos CDK. La fosfatasa PP2A-B55, activa durante interfase, impide la activación de los complejos CDK1-ciclina B1 mediante desfosforilación de sus reguladores, hCdc25 y Wee1 (Jeong and Yang, 2013; Mochida et al., 2009). La actividad de PP2A-B55 es, a su vez, regulada por la quinasa Greatwall la cual fosforila a Ensa (α -*Endosulfine*) y Arpp19 (*Adenosine monophosphateregulated phosphoprotein 19*) permitiendo la unión de estas proteínas a PP2A-B55 con la consiguiente inhibición de la fosfatasa (Figura I-2) (Gharbi-Ayachi et al., 2010; Vigneron et al., 2009; Voets and Wolthuis, 2010).

La fosfatasa hCdc14A también impide la activación prematura de los complejos CDK1-ciclina B1 mediante la regulación de la quinasa inhibidora Wee1, y de las fosfatasas activadoras hCdc25. hCdc14A interacciona con hCdc25B desfosforilándola e inhibiendo su actividad catalítica en la transición G2/M. También inhibe la actividad de hCdc25A de manera indirecta (Vazquez-Novelle et al., 2010). Esta función también la lleva a cabo a través de la

estabilización de Wee1 por desfosforilación directa de los residuos de CDK, Ser¹²³ y Ser¹³⁹ (Figura I-2) (Ovejero et al., 2012).

Una vez alcanzada la máxima actividad de los complejos CDK1-ciclina B1, se inicia la entrada en mitosis y la progresión por sus fases más tempranas, caracterizadas por procesos como la duplicación y separación de los centrosomas, la rotura de la envuelta nuclear y la condensación cromosómica. Todos estos procesos están mediados por fosforilación de numerosos sustratos de CDK (Nigg, 2001).

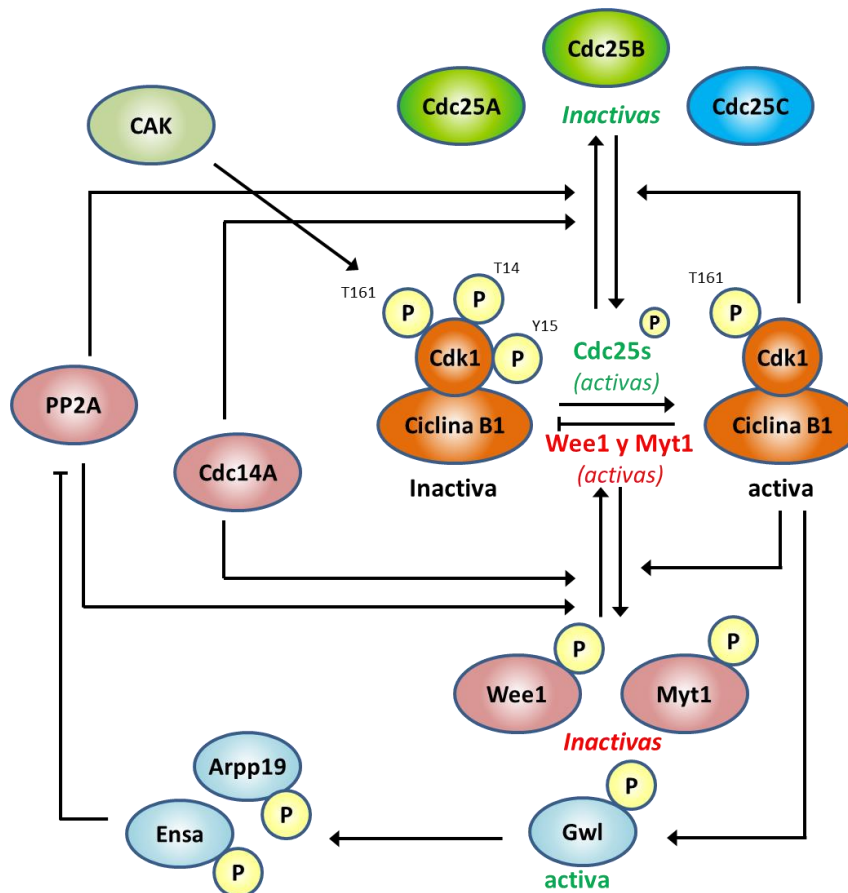


Figura I-2. Regulación de los complejos Cdk1-Ciclina B1 en la transición G2/M. La activación de los complejos CDK1-ciclina B1 se ve inhibida por fosforilaciones en los residuos Thr¹⁴ y Tyr¹⁵ por las quinasas Wee1 y Myt1. Estas fosforilaciones son revertidas por las fosfatasas de la familia hCdc25 (hCdc25A, hCdc25B y hCdc25C), proceso que activa a los complejos CDK-mitóticos. Una vez activos, estos amplifican su propia actividad fosforilando a sus reguladores, inhibiendo y favoreciendo la degradación de las quinasas Myt1 y Wee1, respectivamente, y estabilizando y activando las fosfatasas hCdc25A, hCdc25B y hCdc25C. La fosfatasa PP2A-B55 impide la activación prematura de los complejos CDK1-ciclina B1 mediante desfosforilación de los reguladores hCdc25 y Wee1. La fosfatasa hCdc14A también impide la activación prematura de los complejos CDK1-ciclina B1 mediante la regulación de la quinasa inhibidora Wee1, y de las fosfatasas activadoras hCdc25.

2. Regulación de la entrada en mitosis por otras quinasas

Además de los complejos CDK, en la entrada en mitosis participan otras quinasas, las cuales son importantes tanto por intervenir en la activación de los propios complejos CDK como por controlar diferentes eventos que permiten la correcta entrada y progresión por mitosis.

2.1 Quinasas de la familia Polo

Las quinasas de la familia Polo (*PLKs*, *Polo Like Kinases*) fosforilan residuos de serina y treonina. Concretamente, en células de mamífero se han descrito 5 miembros de esta familia (PLK1-PLK5), de las cuales PLK1 y PLK4 tienen funciones importantes en el control del ciclo celular, siendo PLK1 la más estudiada y la que tiene un papel más importante en la regulación de la mitosis.

En la transición G2/M, **PLK1** fosforila diferentes proteínas reguladoras del ciclo como Wee1, mediando su degradación (Watanabe et al., 2005), Myt1, inhibiendo su actividad (Nakajima et al., 2003), hCdc25C, promoviendo su acumulación en el núcleo (Elia et al., 2003) y ciclina B1, contribuyendo a la activación de los complejos CDK1-ciclina B1 (Jackman et al., 2003; Toyoshima-Morimoto et al., 2001). Además, mediante la fosforilación de diversos sustratos, regula diferentes procesos mitóticos como la segregación cromosómica, la elongación del huso mitótico en anafase y la citocinesis (de Carcer et al., 2011; Petronczki et al., 2008; Santamaria et al., 2007).

2.2 Quinasas de la familia Aurora

Las quinasas de la familia Aurora son muy importantes en el control de diversos procesos mitóticos que abarcan desde la transición G2/M hasta la citocinesis. En células de mamífero existen tres proteínas pertenecientes a esta familia de quinasas con capacidad para fosforilar residuos de serina y treonina: Aurora A, Aurora B y Aurora C, esta última muy similar a Aurora B y que presenta altos niveles de expresión en testículos (Yan et al., 2005).

La quinasa **Aurora A** desempeña un papel esencial en la transición G2/M mediante la regulación de la maduración de los centrosomas (Mori et al., 2007), el ensamblaje del huso mitótico (Fu et al., 2007) y la activación de los complejos CDK1-ciclina B1 mediante fosforilación de hCdc25B (Dutertre et al., 2004).

Aurora B, junto con tres subunidades no enzimáticas, INCENP, Survivin y Borealin, forma el complejo CPC (*Vader et al., 2006*). Los componentes no enzimáticos del complejo controlan la especificidad de sustrato, la actividad y la estabilidad de la quinasa Aurora B (Lens et al., 2006). Este complejo presenta una localización muy dinámica durante la mitosis. Inicialmente se detecta a lo largo de los brazos de los cromosomas y progresivamente se va concentrando en los centrómeros durante prometáfase y metafase (Figura I-3) (Monier et al., 2007). Este enriquecimiento en los centrómeros requiere de fosforilaciones específicas en dos

residuos en las colas de las histonas como son la treonina 3 en la histona H3 (H3T3) por la quinasa Haspin (Dai et al., 2005) y la treonina 120 en la histona H2A (H2AT120) por la quinasa BUB1 (Kawashima et al., 2007). Esta localización del CPC en mitosis temprana es necesaria para llevar a cabo diferentes funciones como el mantenimiento de la estructura de los cromosomas mitóticos, catalizando la fosforilación en el residuo Ser¹⁰ de la histona H3 (Chang et al., 2006) y regulando la unión de la Condensina (Collette et al., 2011). Este complejo también regula la formación de la estructura trilaminar del cinetocoro, las correctas uniones cinetocoro-microtúbulo, la adecuada orientación bipolar de los cromosomas y el ensamblaje del huso mitótico (Hua et al., 2011; Ruchaud et al., 2007; Tanno et al., 2010; Vazquez-Novelle and Petronczki, 2010; Welburn et al., 2010). Aurora B también tiene una función muy importante en el *checkpoint* del ensamblaje del huso mitótico promoviendo el reclutamiento hacia el cinetocoro de las diferentes proteínas del SAC (Saurin et al., 2011).

En anafase y telofase, el CPC se transfiere desde los centrómeros hacia la zona media del huso mitótico y, finalmente, se concentra en el cuerpo medio durante citoquinesis (Figura I-3). Esta localización viene determinada por la desfosforilación del residuo Thr3 en la histona H3 que lo mantenía asociado a cromatina (Qian et al., 2011) e igualmente requiere de la interacción de INCENP y Aurora B con la quinesina unida a microtúbulos en la zona central del huso mitótico, MKLP2. Esta interacción ocurre en anafase cuando se revierten las fosforilaciones inhibitorias sobre INCENP, mediadas por CDK1 (Hummer and Mayer, 2009; Vazquez-Novelle and Petronczki, 2010), posiblemente por la fosfatasa hCdc14A en base a los resultados obtenidos *in vitro* (Gruneberg et al., 2004). En este punto, el complejo CPC lleva a cabo diferentes funciones como la formación y estabilización de la zona media del huso (Douglas et al., 2010a), la regulación de la formación y función del anillo contráctil (Su et al., 2011) y la regulación del proceso de abscisión en la citoquinesis (Carlton et al., 2012).

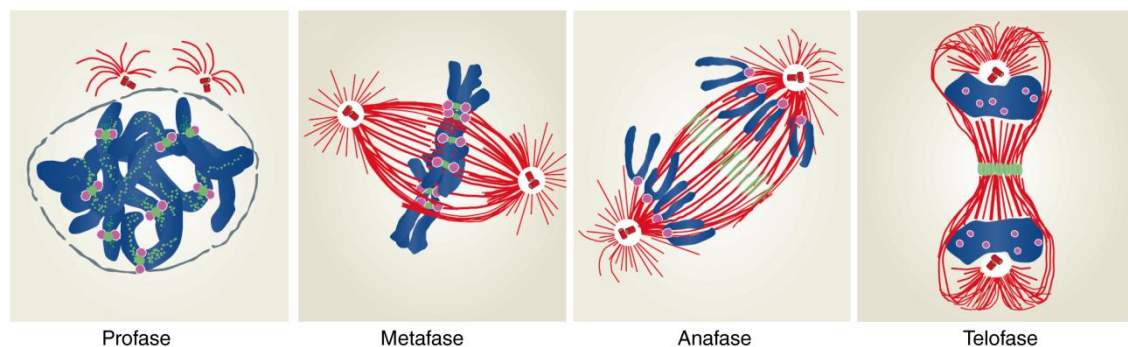


Figura I-3. Localización del CPC durante mitosis. La representación esquemática muestra la localización de Aurora B en verde, los cinetocoros en rosa, la α -tubulina en rojo y el DNA en azul. En profase, Aurora B se localiza en los brazos de los cromosomas y comienza a acumularse en los centrómeros. En metafase, su localización es centromérica. Durante anafase y telofase, Aurora B se relocaliza en la zona media del huso mitótico. Modificado de Ruchaud et al., 2007.

2.3 Quinasas de la familia NIMA

Las quinasas de la familia NIMA reciben este nombre por el gen NIMA (Never In Mitosis A), identificado en *Aspergillus nidulans* (Osmani and Ye, 1996). En células humanas existen 11 homólogos distintos de esta familia, de los cuales al menos NEK2, NEK6, NEK7 y NEK9 están implicados en la regulación de la mitosis (O'Regan et al., 2007). La quinasa NEK2 participa en la separación de los centrosomas así como en el reclutamiento de PLK1 hacia los mismos (O'Regan et al., 2007). Posteriormente NEK9, activada por CDK1, está implicada en la maduración de los centrosomas, así como en la activación de NEK6 y NEK7 para su participación en la formación del huso mitótico y la consecuente progresión por mitosis (Bertran et al., 2011; Sdelci et al., 2012).

2.4 Greatwall

La quinasa Greatwall se descubrió en *Drosophila melanogaster* con función importante en la regulación de la actividad de las quinasas PLK, en la condensación del DNA y en el inicio de la mitosis (Glover, 2012; Yu et al., 2004). El ortólogo en células humanas se denomina MAST-L (*Microtubule-associated serine/threonine kinase-like protein*) (Burgess et al., 2010). Gwl/MAST-L es activada por los complejos CDK1-Ciclina B1 e inhibe a la fosfatasa PP2A, favoreciendo la entrada en mitosis (Vigneron et al., 2009; Voets and Wolthuis, 2010).

III. REGULACIÓN DE LA SALIDA DE MITOSIS

La salida de mitosis incluye aquellos procesos que tienen lugar durante las últimas etapas de la mitosis, desde el comienzo de la segregación de los cromosomas duplicados (anafase), el posterior desensamblaje del huso mitótico, la descondensación de los cromosomas en cada una de las células hijas (telofase), la reorganización de la envuelta nuclear y el aparato de Golgi, ...etc, hasta concluir con la citoquinesis (Sullivan and Morgan, 2007).

Para la entrada en mitosis y progresión por sus primeras fases, hasta metafase, es necesaria una elevada actividad CDK mitótica. Sin embargo, para que se produzca la salida de mitosis es necesario que la actividad de los complejos CDK mitóticos descienda drásticamente y sus sustratos, así como los de otras quinasas mitóticas, sean desfosforilados y/o degradados (Potapova et al., 2011; Skoufias et al., 2007; Sullivan and Morgan, 2007). Estos procesos de desfosforilación y degradación están estrictamente regulados y deben ocurrir en un orden concreto para que la división celular concluya con éxito.

1. Degradación proteica mediada por el complejo APC/C

La secuencia de desfosforilación de los sustratos de CDK depende, en parte, del orden en el cual las ciclinas son destruidas. Teniendo en cuenta que este proceso de desfosforilación conduce los eventos tardíos de la mitosis, es consecuente que la destrucción ordenada de las diferentes ciclinas pueda ayudar a ordenar los eventos de la mitosis tardía (Sullivan and Morgan, 2007). La degradación de diferentes proteínas durante la salida de mitosis está regulada principalmente por el complejo APC/C (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*). Este complejo poliubiquitina numerosas proteínas marcándolas para su destrucción por el proteasoma de forma ordenada en el tiempo. Algunos de estos sustratos son las ciclinas mitóticas, cuya destrucción es esencial para que se inactiven los complejos CDK, las quinasas mitóticas de las familias Polo y Aurora, o la securina, cuya degradación es necesaria para eliminar los complejos de cohesina de las cromátidas permitiendo su separación (Lindqvist et al., 2009; Oliveira and Nasmyth, 2010; Pines, 2011; Sullivan and Morgan, 2007). El complejo APC/C consta de 11 subunidades diferentes en células animales (Passmore, 2004). Además de estos componentes que forman el núcleo del complejo, requiere de miembros de la familia WD40 (Cdc20, Cdh1 y Ama1), que actúan en diferentes momentos del ciclo celular reconociendo y reclutando determinados sustratos que van a ser poliubiquitinados (Vodermaier et al., 2003; Burton et al., 2005, Kraft et al., 2005).

Dada la importancia del complejo APC/C durante mitosis, su función es regulada mediante diversos mecanismos. Es activado primero durante prometafase temprana por su coactivador Cdc20, el cual aunque se expresa ya durante las fases S y G2, solo se asocia al complejo en mitosis, tras la fosforilación de múltiples subunidades de APC/C por quinasas mitóticas como los complejos CDK1-ciclina B1 y PLK1 (Herzog et al., 2005). Algunos sustratos específicos del complejo APC/C como la ciclina A, la quinasa NEK2 y el factor de transcripción HOXC10 son degradados durante prometafase, mientras que otros como la securina y la ciclina B1 no son degradados hasta metafase (Peters, 2006). Este orden en la degradación de sustratos por **APC/C^{Cdc20}** es regulado por la activación del *checkpoint* del ensamblaje del huso mitótico desde el inicio de mitosis, el cual previene la unión de Cdc20 al APC/C y con ello la destrucción de securina y ciclina B1 hasta que todas cromátidas hermanas están correctamente unidas al huso mitótico, formando la placa metafásica. En este momento APC/C^{Cdc20} deja de estar inhibido y securina y ciclina B1 son degradadas. (Musacchio and Salmon, 2007).

Posteriormente, en anafase, se produce la activación del complejo **APC/C^{Cdh1}** mediado por desfosforilación del coactivador Cdh1, quizás por hCdc14A, en base a los datos obtenidos *“in vitro”* (Bembenek and Yu, 2001). La activación de este complejo en anafase lleva a la destrucción secuencial de sus sustratos siendo degradado primero Cdc20, seguido por PLK1, después Aurora A y finalmente Aurora B (Acquaviva and Pines, 2006). Este orden de destrucción permite garantizar la adecuada progresión por las últimas fases de la mitosis y depende, por un lado, de la afinidad existente entre las secuencias de las proteínas a marcar y

los sitios de unión en Cdh1 o APC/C, y por otro, de la localización subcelular de la ubiquitin-ligasa y sus sustratos (Sullivan and Morgan, 2007).

2. Desfosforilación de sustratos a la salida de mitosis

La importancia de las proteínas quinasas en el control espacial y temporal de los eventos mitóticos es un tema ampliamente estudiado ya que han sido consideradas como las principales responsables de estos procesos, mientras que las fosfatasas parecían tener un papel secundario. Sin embargo, el trabajo de los últimos años ha puesto de manifiesto la importancia de las fosfatasas que revierten dichas fosforilaciones así como la importancia de un adecuado balance entre actividades quinasa y fosfatasa en el control mitótico (Bollen et al., 2009; Trinkle-Mulcahy and Lamond, 2006). El orden en el que se produce la desfosforilación de los sustratos de las quinasas mitóticas no está determinado simplemente por el momento en el que se produce la inactivación de estas, sino que la especificidad de las fosfatasas hacia los sustratos tiene una considerable importancia en este orden. Estas desfosforilaciones regulan eventos claves como el desensamblaje del huso mitótico, la descondensación de los cromosomas, la reorganización de la envuelta nuclear y la posterior citoquinesis.

En *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc14 es una fosfatasa esencial para la salida de mitosis cuya función y regulación están muy bien caracterizadas. Participa en procesos como la segregación cromosómica, la elongación del huso mitótico y la citoquinesis (Queralt and Uhlmann, 2008). Cdc14 está conservada a lo largo de la evolución, sin embargo, trabajos recientes ponen de manifiesto que esta función no está conservada en otros organismos eucariotas, en los que las fosfatasas de la familia PP1 y PP2A, mencionadas con más detalle en el apartado siguiente, parecen ser las responsables de coordinar los diferentes eventos que tienen lugar a la salida de mitosis.

En la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, el ortólogo de Cdc14, Flp1/Clp1, participa en la inactivación de los complejos Cdk a la salida de mitosis, sin embargo son fosfatasas de la superfamilia PPP (*PhosphoProtein Phosphatases*) las responsables de la salida de mitosis. Así, la activación de la fosfatasa PP1 es necesaria para la posterior activación secuencial de PP2A-B55 y de PP2A-B56, necesarias para coordinar la progresión y la salida de mitosis (Grallert et al., 2014). La unión de PP1 a la fosfatasa PP2A-B55 promueve la activación de esta última en anafase. En mitosis temprana, esta activación está bloqueada puesto que los complejos Cdk fosforilan a PP1 inactivándola y también promoviendo su degradación. Sin embargo, cuando la actividad Cdk disminuye en etapas finales de la mitosis, PP1 (asociada a PP2A-B55) se activa por autodesfosforilación y activa y promueve la liberación de PP2A-B55. Posteriormente, PP2A-B55 desfosforila a PP2A-B56 permitiendo su unión con PP1. PP1, a su vez, desfosforila a PP2A-B56 activándola (Grallert et al., 2014). Las secuencias de unión de PP2A-B56 a PP1 están conservadas en células humanas observándose que ambas fosfatasas son capaces de interactuar. Esto sugiere que la

activación secuencial de las fosfatasa PP2A por PP1 podría estar conservada evolutivamente en otros organismos eucariotas.

En células animales, varias fosfatasa han sido implicadas en la regulación de la salida de mitosis, siendo también las fosfatasa de las familias PP1 y PP2A las que parecen tener un papel más relevante. Las funciones descritas para estas fosfatasa así como sus sustratos en este punto del ciclo se desarrollan a continuación.

2.1 Fosfatasa PP2A

Las fosfatasa PP2A desfosforilan residuos de serina y treonina. Son complejos heterotriméricos formados por una subunidad estructural ($A\alpha$, $A\beta$), una subunidad catalítica ($C\alpha$, $C\beta$) y una subunidad reguladora (B), de la que existen cuatro familias con diversos miembros cada una. Potencialmente se pueden formar más de 70 complejos heterotriméricos diferentes combinando estas 3 subunidades (Virshup and Shenolikar, 2009).

PP2A, junto con subunidades reguladoras de la familia B55, ha sido implicada en la regulación de la salida de mitosis en metazoa. En el organismo *Xenopus laevis*, PP2A junto con la subunidad reguladora B55 δ tiene una función importante en la desfosforilación ordenada de sustratos de CDK1 a la salida de mitosis (Mochida et al., 2009). En el caso de células humanas, PP2A-B55 α participa en la desfosforilación de sustratos de CDK1, regulando procesos como el desensamblaje del huso mitótico y la descondensación de los cromosomas (Schmitz et al., 2010). En fibroblastos de ratón, la depleción de las subunidades B55 α o B55 δ retrasa la salida de mitosis indicando que ambas tienen una función importante en este punto del ciclo (Manchado et al., 2010). La función de PP2A en las etapas finales de la mitosis no solo está determinada por la desfosforilación de los sustratos de CDK1-ciclina B1 sino también por la inactivación de estos complejos. En células humanas, PP2A-B56 δ participa en la inactivación de CDK1 desfosforilando e inactivando a hCdc25C a la salida de mitosis (Forester et al., 2007).

2.2 Fosfatasa PP1

Las fosfatasa PP1 son complejos heterodiméricos formados por una subunidad catalítica (PP1 α , PP1 β , PP1 γ 1, PP1 γ 2) y una subunidad reguladora, de la cual hay mucha diversidad. Las subunidades reguladoras pueden actuar inhibiendo a PP1, restringiendo su especificidad de sustrato o llevando el complejo hacia localizaciones subcelulares concretas (Bollen et al., 2010).

PP1, junto con la subunidad reguladora p99/PNUTS, actúa regulando la descondensación de la cromatina a la salida de mitosis (Landsverk et al., 2005). También se ha descrito una función para PP1, junto con la subunidad reguladora AKAP149, desfosforilando Láminas de tipo B en telofase, permitiendo así su polimerización y el reensamblaje de la envuelta nuclear (Steen et al., 2003).

El complejo PP1 γ -RepoMan participan en el control de la arquitectura de los cromosomas en anafase mediante desfosforilación del residuo H3S10, la cual es necesaria para la reasociación de HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) a la cromatina y la consiguiente formación de la heterocromatina en G1 (Vagnarelli et al., 2011). También regula la localización del complejo CPC en anafase mediante desfosforilación del residuo H3T3, lo que elimina el sitio de unión del complejo a la cromatina y promueve su transferencia desde los centrómeros a la zona central del huso mitótico (Qian et al., 2011). Estas funciones las lleva a cabo PP1 en asociación con la subunidad reguladora, RepoMan, que recluta el complejo hacia la cromatina anafásica. De este modo, resulta de gran importancia la adecuada localización de esta subunidad reguladora. RepoMan presenta distinta localización en las diferentes etapas del ciclo celular. Se localiza en el nucleoplasma durante interfase, pasando a mostrar una localización difusa en las etapas iniciales de la mitosis, para finalmente acumularse en cromatina en las etapas finales de la misma (Trinkle-Mulcahy and Lamond, 2006) (Figura I-4). Esta localización está regulada por procesos de fosforilación/desfosforilación. Es fosforilada al inicio de mitosis por los complejos CDK1-ciclina B1 en el residuo Thr⁴¹² junto con otros, y también por Aurora B en el residuo Ser⁸⁹³, siendo estas fosforilaciones las que determinan su localización en mitosis temprana. Estos residuos son desfosforilados al inicio de anafase permitiendo la interacción de RepoMan con PP1 γ y el reclutamiento de estos complejos hacia los cromosomas (Vagnarelli et al., 2011).

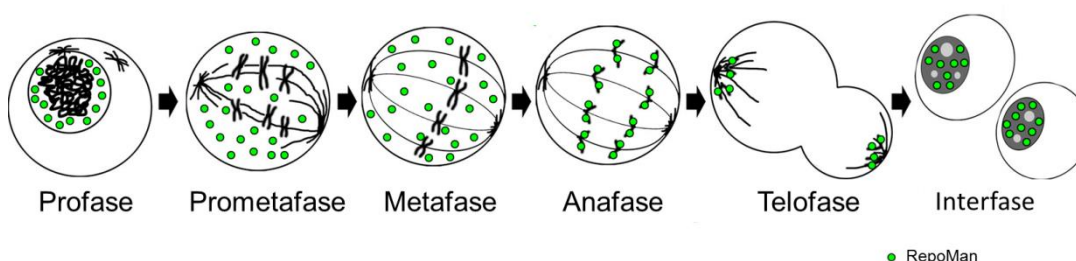


Figura I-4. Localización de RepoMan a lo largo del ciclo celular. RepoMan se localiza inicialmente en el nucleoplasma durante interfase. En prometáfase y metafase, muestra una localización difusa pasando a relocalizarse asociado a cromatina en anafase y telofase. Modificado de Trinkle-Mulcahy et al., 2006.

Aunque se han descrito diferentes sustratos para PP1 a la salida de mitosis, su función no parece ser esencial en este punto del ciclo. En estudios llevados a cabo en *Xenopus laevis*, algunos grupos observan un retraso en la desfosforilación de varios sustratos de CDK1 tras inmunodepleción de PP1 (Wu et al., 2009), mientras que otros no observan tales efectos (Castilho et al., 2009; Mochida et al., 2009). En células humanas, no se han identificado subunidades catalíticas ni reguladoras de los complejos PP1 como proteínas clave para la salida de mitosis (Schmitz et al., 2010). Sin embargo, estos estudios no cierran las puertas a una posible contribución de PP1 en la regulación de la salida de mitosis debido a las limitaciones técnicas inherentes a los estudios de inmunodepleción y uso de RNAs de

interferencia utilizados en ellos e, igualmente, a una potencial redundancia entre las diferentes subunidades catalíticas de los complejos PP1.

2.3 Fosfatasa Fcp1

Fcp1 fue inicialmente identificada como una fosfatasa que participa en el control de la transcripción mediante desfosforilación del dominio carboxilo terminal de la RNA polimerasa II (Amente et al., 2005; Archambault et al., 1998). Estudios recientes sugieren su participación en la salida de mitosis desfosforilando a Cdc20, USP44, Wee1 y Ensa (Hegar et al., 2014; Visconti et al., 2012). Participa en la inactivación de los complejos CDK1-ciclina B1 a través de la desfosforilación de Wee1, permitiendo que posteriormente otras fosfatasas puedan desfosforilar los sustratos de estos complejos permitiendo completar la mitosis y la citocinesis (Visconti et al., 2012).

2.4 Fosfatasas Cdc14

Puesto que las fosfatasas de esta familia son el objeto de nuestro estudio las describiremos con más detalle en la siguiente sección.

FOSFATASAS DE LA FAMILIA Cdc14

Las proteínas Cdc14 se incluyen dentro de la superfamilia de “Proteínas-Tirosina Fosfatasas” considerándose como “fosfatasas de especificidad dual” por su capacidad para desfosforilar residuos de serina, treonina o tirosina. Esta familia de fosfatasas está conservada evolutivamente desde levaduras hasta metazoa. Todas las fosfatasas de la familia Cdc14 presentan un dominio N-terminal altamente conservada de unos 350 aminoácidos que contiene un motivo catalítico de tipo PTP (*Protein-Tyrosine Phosphatases*) (Gray et al., 2003). El dominio C-terminal tiene mayor variabilidad y contiene una secuencia de exportación nuclear (NES) que determina el transporte de estas fosfatasas fuera del núcleo en todos los eucariotas en los que se han identificado (Figura I-5) (Bembenek and Yu, 2001; Mohl et al., 2009).

Pueden revertir las fosforilaciones llevadas a cabo por los complejos CDK y por MAP quinasas. Estudios recientes indican que desfosforilan preferentemente residuos fosforilados por CDKs que presentan en su secuencia un aminoácido básico en posición +3 con respecto a una serina seguida de prolina (Bremmer et al., 2012). Los miembros de esta familia actúan como antagonistas de la actividad CDK y tienen diversas funciones, muchas de ellas relacionadas con la regulación del ciclo celular.

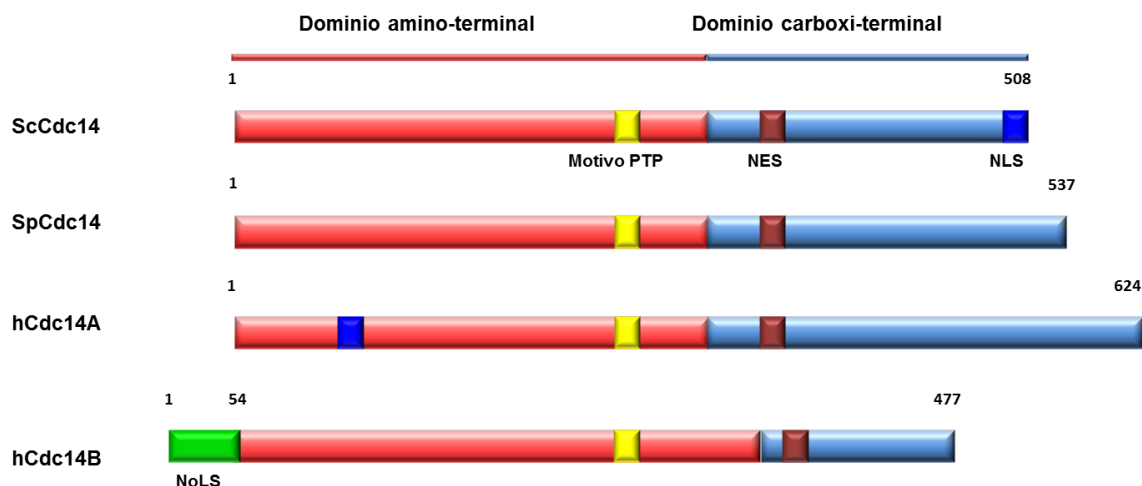


Figura I-5. Representación esquemática de la estructura primaria de Cdc14 en diferentes especies. El dominio amino-terminal, más conservado, se muestra en rojo, el dominio carboxi-terminal aparece en azul claro. La secuencia de localización nucleolar (NoLS), en verde, el motivo con actividad catalítica (PTP), en amarillo, la secuencia de localización nuclear (NLS), en azul oscuro y la secuencia de exclusión nuclear (NES), en granate. Modificado de Mocciaro and Schiebel, 2010.

1. Cdc14 en *Saccharomyces cerevisiae*

Cdc14 es una proteína esencial para la salida de mitosis en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La activación de esta fosfatasa es un evento clave para el control de diferentes procesos característicos de la salida de mitosis como la segregación cromosómica, la elongación del huso mitótico y la citoquinesis. Esta fosfatasa actúa tanto inactivando los complejos Cdk mitóticos como desfosforilando los sustratos de Cdk (Queralt and Uhlmann, 2008).

El orden de desfosforilación de los sustratos en esta fase del ciclo viene determinado por la regulación de la localización y activación de Cdc14 gracias a las rutas FEAR (*Fourteen Early Anaphase Release*) y MEN (*Mitosis Exit Network*). Cdc14 se localiza en el nucléolo hasta el inicio de anafase, momento en el que comienza la liberación de parte de esta proteína promovida por la ruta FEAR (Azzam et al., 2004). En este punto, Cdc14 promueve la elongación del huso en anafase mediante la desfosforilación de proteínas localizadas en la zona media del huso como Ase1 (*Anaphase Spindle Elongation*) y Fin1 (*Filaments Inbetween Nuclei 1*) (Khmelniskii et al., 2007), regula la traslocación del complejo CPC desde los centrómeros hacia la zona media del huso mitótico, promovida por desfosforilación de Sli15, ortólogo de INCENP (Pereira and Schiebel, 2003), y regula la correcta segregación del DNA ribosómico y de las regiones teloméricas al reprimir la transcripción de estas regiones mediante la inhibición de las RNA polimerasas I y II, respectivamente (Clemente-Blanco et al., 2009; Clemente-Blanco et al., 2011). La completa liberación y activación de esta proteína durante anafase es mediada por la ruta MEN (Queralt and Uhlmann, 2008). Cdc14 es necesaria para la citoquinesis mediante desfosforilación de diferentes sustratos de Cdk como Inn1, cuya

desfosforilación promueve su reclutamiento hacia la zona media justo antes de que se produzca la constricción del anillo de actomiosina. En esta localización activa a Chs2, componente del complejo Chitin sintasa II, necesaria para el inicio del septum primario (Kuilman et al., 2014).

Trabajos recientes también han implicado a Cdc14 en el proceso de recombinación homóloga regulando la actividad y localización de la nucleasa Yen1. La fosforilación de Yen1 por Cdk asegura la localización citoplasmática de la nucleasa e inhibe su actividad catalítica al inicio de mitosis. Estas acciones inhibitorias de la fosforilación por Cdk son revertidas por Cdc14. De esta forma, se restringe la actividad de la nucleasa Yen1 a las fases finales de la mitosis favoreciendo que las uniones tipo Holliday, generadas durante la recombinación homóloga, sean disueltas por otras nucleasas evitando el intercambio de secuencias entre las cromátidas (Blanco et al., 2014; Eissler et al., 2014).

2. Cdc14 en *Schizosaccharomyces pombe*

El ortólogo de Cdc14 en la levadura de fisión, Flp1, también denominada Clp1, no es una proteína esencial aunque las células que carecen de ella entran de forma prematura en mitosis y muestran defectos en septación (Cueille et al., 2001). Flp1 se localiza en el nucléolo y en el SPB (*Spindle Pole Body*) durante interfase. Cuando las células entran en mitosis, Flp1 es liberada desde el nucléolo y comienza a localizarse en el núcleo, el huso mitótico y el anillo medial durante la mitosis, manteniéndose inhibida en este punto por fosforilación por Cdk (Cueille et al., 2001; Wolfe et al., 2006). La bajada en la actividad de Cdk a la salida de mitosis permite el inicio de la actividad de Flp1 mediante autodesfosforilación (Wolfe et al., 2006). Flp1 se mantiene fuera del nucléolo gracias a la ruta SIN (*Septation Initiation Network*), que es una cascada de señalización que no es necesaria para la activación de Flp1 pero sí contribuye a mantener su liberación nucleolar hasta la finalización de la citoquinesis (Cueille et al., 2001; Mishra et al., 2005).

Flp1 regula la entrada en mitosis y también es importante durante la salida de la misma, coordinando la división nuclear y la citoquinesis (Cueille et al., 2001; Esteban et al., 2004; Trautmann et al., 2001). Contribuye a la disminución de la actividad Cdk mediante desfosforilación y desestabilización de la fosfatasa activadora Cdc25 (Esteban et al., 2004). También regula la interacción de los microtúbulos del huso mitótico con los cinetocoros (Choi et al., 2009), además de participar en la segregación de los cromosomas (Chen et al., 2011a; Trautmann et al., 2004). Por otra parte, se ha comprobado que Flp1 juega un papel importante en el establecimiento del *checkpoint* frente a estrés replicativo. Ante diferentes tipos de estrés genotóxico, Flp1 sale del nucléolo hacia el núcleo por un mecanismo dependiente de fosforilaciones por las quinasas efectoras del *checkpoint* Cds1, Chk1 y otras quinasas como Pmk1 y Cdk1. Fuera del nucléolo, Flp1 desfosforila a Cds1 permitiendo su completa activación (Broadus and Gould, 2012; Diaz-Cuervo and Bueno, 2008).

3. Fosfatasas Cdc14 en células humanas

En células humanas, como en el resto de mamíferos, existen dos isoformas de la familia hCdc14 denominadas hCdc14A y hCdc14B que comparten aproximadamente un 50% de identidad de secuencia. Además, exclusivamente en homínidos se ha identificado otro miembro de esta familia, denominado hCdc14C o hCdc14B retro, que procede de la retroduplicación génica de hCdc14B y se encuentra localizado fundamentalmente en cerebro y testículos (Rosso et al., 2008).

Las fosfatasas Cdc14 humanas rescatan la falta de Cdc14 en *Saccharomyces cerevisiae* (Cho et al., 2005) y de Flp1 en *Schizosaccharomyces pombe* (Vazquez-Novelle et al., 2005), lo que indica que al menos algunas de sus funciones están conservadas en los diferentes organismos.

3.1 hCdc14A

Estudios iniciales pusieron de manifiesto que los niveles proteicos y de actividad de hCdc14A no parecen sufrir variaciones relevantes a lo largo del ciclo celular, lo que sugiere que su regulación se debe principalmente a cambios en su localización subcelular (Kaiser et al., 2002; Mailand et al., 2002a) o a diferencias en la interacción con sus sustratos. Durante interfase la proteína hCdc14A se localiza en el citoplasma y en los centrosomas de las células gracias a la presencia de una secuencia NES en su extremo carboxilo, necesaria para la exportación de esta proteína desde el núcleo. Igualmente son necesarias las regiones amino y carboxilo terminal de esta secuencia para su adecuada localización en centrosomas (Mailand et al., 2002a). En la transición G2/M, comienza a disociarse de los centrosomas difundiendo por toda la célula (Mailand et al., 2002a). También se observa a hCdc14A en los centrómeros de los cromosomas como consecuencia de su interacción con PLK1 (Yuan et al., 2007). Durante anafase y telofase, hCdc14A se localiza en los polos del huso mitótico y en la zona central del mismo colocalizando con PLK1, el complejo CPC y MKLP2, quinesina responsable de la localización de estas proteínas en la zona central del huso mitótico (Gruneberg et al., 2004). Además de la regulación de hCdc14A a través de su localización subcelular, también su actividad catalítica puede ser modificada por medio de la fosforilación por parte de PLK1 de dos residuos de la proteína, Ser³⁵¹ y Ser³⁶³ en la región carboxilo, lo que conlleva la disociación de un puente intramolecular, inhibidor de su actividad (Yuan et al., 2007).

En los últimos años, numerosos estudios se han centrado en conocer las funciones que desempeña hCdc14A así como los sustratos sobre los que actúa. La fosfatasa hCdc14A participa en la regulación del ciclo de división del centrosoma, de la segregación cromosómica y de la citoquinesis (Kaiser et al., 2002; Mailand et al., 2002a). La depleción de hCdc14A da lugar a múltiples anomalías mitóticas entre las que se observan intentos abortados de realizar anafase y/o fallos en llevar a cabo la abscisión citoplasmática que culminan en la formación de células binucleadas. Esta incapacidad de ejecutar mitosis productivas en células deplecionadas

para hCdc14A podría estar asociada con la pérdida de separación de los centrosomas duplicados (Mailand et al., 2002a). Sin embargo, aún se desconocen los sustratos a través de los cuales llevaría a cabo esta función. Estudios de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto la función de hCdc14A en la regulación de la entrada en mitosis. hCdc14A previene la entrada prematura en mitosis inhibiendo la actividad catalítica de las fosfatasa activadoras hCdc25B y hCdc25A (Vazquez-Novelle et al., 2010) y promoviendo la estabilización de la quinasa inhibidora Wee1 (Ovejero et al., 2012).

Se han descrito diferentes sustratos para esta fosfatasa a través de los cuales podría estar regulando diferentes procesos celulares, muchos de ellos relacionados con la regulación del ciclo celular.

hCdc14A se une y desfosforila los residuos de **hCdc25B** fosforilados por CDK1. Esta desfosforilación inhibe la actividad catalítica de hCdc25B lo que conlleva un descenso en la actividad de CDK1 a la entrada en mitosis. También regula de forma indirecta la actividad fosfatasa de **hCdc25A** y de forma directa su estabilidad (Esteban et al., 2006; Vazquez-Novelle et al., 2010). hCdc14A desfosforila a **Wee1**, previamente fosforilado por los complejos CDK1-ciclina B1, impidiendo el reconocimiento de esta quinasa por el complejo ubiquitin ligasa SCF- β -TrCP y su posterior degradación a la entrada en mitosis (Ovejero et al., 2012; Watanabe et al., 2005; Watanabe et al., 2004).

El supresor tumoral **p53** es también un sustrato de hCdc14A (Li et al., 2000; Paulsen et al., 2006), importante en la regulación del ciclo de división de los centrosomas (Tarapore and Fukasawa, 2002; Tarapore et al., 2001).

Otro sustrato de hCdc14A es **Cdh1**, cuya desfosforilación es necesaria para su unión con el complejo APC/C y su consecuente activación a la salida de mitosis (Bembenek and Yu, 2001).

El componente del CPC, **INCENP**, es desfosforilado por hCdc14A. La desfosforilación de INCENP parece ser necesaria para la posterior interacción del complejo INCENP-Aurora B con MKLP2 y su reclutamiento hacia la zona media del huso, pudiendo ser hCdc14A la fosfatasa responsable de esta regulación (Gruneberg et al., 2004).

Sirt2 es una desacetilasa (*NADC, NAD-dependent Deacetylase*) cuya estabilidad está regulada por procesos de fosforilación/desfosforilación. Esta desacetilasa participa en la condensación de la cromatina en la transición G2/M y en la regulación de la salida mitosis (Inoue et al., 2007; North and Verdin, 2007a). hCdc14A es capaz de desfosforilarla (North and Verdin, 2007b).

PR-Set7 es una histona metiltransferasa que específicamente monometila la Lys 20 de la histona H4 para la compactación de la cromatina y la represión transcripcional de determinados genes (Kalakonda et al., 2008; Sims and Rice, 2008). Es fosforilada al inicio de mitosis por los complejos CDK1-ciclina B1 y posteriormente desfosforilada por hCdc14A, lo que permite su reconocimiento por el complejo APC/C y su posterior degradación, proceso importante para la salida de mitosis (Wu et al., 2010).

KIBRA (*Kidney and BRAin-expressed protein*) es un regulador de la ruta Hippo que controla el crecimiento tisular y la tumorigénesis regulando la proliferación celular y la apoptosis. hCdc14A es capaz de desfosforilarlo *in vitro* en residuos fosforilados por los complejos CDK1-ciclina B1 (Ji et al., 2012).

hCdc14A, junto con Cdc14B han sido implicadas en la regulación de la transcripción. Ambas fosfatasa son capaces de desfosforilar residuos de serina en la región C-terminal de la **RNA polimerasa II**, regulando su función y como consecuencia la transcripción génica (Guillamot et al., 2011).

La desfosforilación de la proteína **RN-tre** (*GTPase Activating Protein*) por hCdc14A, sugiere la intervención de esta fosfatasa en la regulación de procesos de endocitosis (Lanzetti et al., 2007).

Por último, se ha observado que la desfosforilación de **Erk3** (*MAPK atípica*) por hCdc14A parece promover la estabilización del complejo Erk3-ciclina D3, implicado en la parada del ciclo en G1 y en procesos de diferenciación celular (Hansen et al., 2008).

Aunque algunos de estos sustratos han sido identificados únicamente *in vitro*, sugieren que hCdc14A no solo estaría regulando la entrada en mitosis, sino también la salida de mitosis.

3.2 hCdc14B

Al igual que la isoforma hCdc14A, la regulación de hCdc14B parece estar mediada principalmente por cambios en su localización subcelular. Esta localización subcelular está determinada por la presencia de una secuencia NoLS (*Nucleolar Localization Sequence*) única de 54 aminoácidos en su dominio N-terminal que presenta un motivo KKIR responsable de reclutar la proteína en el nucléolo (Berdougo et al., 2008; Cho et al., 2005; Kaiser et al., 2002; Mailand et al., 2002b; Mocciaro et al., 2010; Rosso et al., 2008). Durante interfase, hCdc14B se encuentra asociada a cromatina (Tumurbaatar et al., 2011) siendo su localización principalmente nucleolar y, en niveles más bajos, también se localiza por todo el núcleo (Berdougo et al., 2008; Kaiser et al., 2002; Mailand et al., 2002a). También se ha detectado proteína asociada a centriolos (Wu et al., 2008), filamentos nucleares (Nalepa and Harper, 2004) y microtúbulos (Cho et al., 2005; Rosso et al., 2008). El secuestro nucleolar representa un mecanismo evolutivamente conservado que podría controlar la función de hCdc14B en etapas definidas de la mitosis (Tumurbaatar et al., 2011). Durante profase tardía, a medida que se produce la condensación de la cromatina y desensamblaje del nucléolo, hCdc14B se dispersa por todo el núcleo. La consiguiente rotura de la envuelta nuclear lleva a que esta proteína presente una localización difusa durante prometáfase y metafase. Finalmente, durante anafase y telofase, hCdc14B se localiza concentrada en la cromatina anafásica así como en los filamentos perinucleares (Berdougo et al., 2008). La asociación de esta fosfatasa con los cromosomas mitóticos es inhibida por CDK1 lo que explica porqué esta asociación se ve

restringida a las últimas fases de la mitosis cuando los niveles de ciclina B1 y la actividad de CDK1 son bajos (Berdougo et al., 2008).

hCdc14B ha sido implicada en el control de la arquitectura nuclear (Nalepa and Harper, 2004), la regulación de la dinámica del huso mitótico y del ciclo de división del centrosoma (Cho et al., 2005; Wu et al., 2008), la regulación de la actividad CDK1-ciclina B1 a la entrada y salida de mitosis (Dryden et al., 2003; Tumurbaatar et al., 2011), la regulación de la transición M/G1 (Rodier et al., 2008), la activación de la respuesta a daño en el DNA en fase G2 (Bassermann et al., 2008; Peddibhotla et al., 2011), la reparación del DNA dañado (Mocciaro and Schiebel, 2010) y la represión transcripcional mediada por regulación de la RNA polimerasa II (Guillamot et al., 2011). Muchas de estas funciones no están aún bien caracterizadas y no se conoce el mecanismo molecular exacto a través del cual hCdc14B las lleva a cabo.

Se ha otorgado una función a hCdc14B en la activación del *checkpoint* de daño al DNA. Tras daño en el DNA en G2, las células activan una ruta de señalización mediante la cual ATR es reclutada al sitio del daño, activándose y fosforilando a la quinasa efectora Chk1, proceso que requiere como mediador la proteína Claspin. Chk1 se trasloca al nucléolo donde posiblemente fosforila a hCdc14B favoreciendo su salida al nucleoplasma (Peddibhotla et al., 2011). En el nucleoplasma, hCdc14B desfosforila a Cdh1 permitiendo la activación del complejo APC/C^{Cdh1}, que marca para su degradación a la quinasa mitótica PLK1 (Bassermann et al., 2008). La degradación de PLK1 induce estabilización de Claspin, proteína necesaria para la activación de Chk1, y de Wee1, quinasa inhibidora de la actividad CDK1. De esta forma, la activación del complejo APC/C^{Cdh1} tiene como resultado la atenuación de la actividad de CDK1, con la consecuente inhibición de la entrada en mitosis para permitir la eficiente reparación del DNA dañado. De este modo, células deplecionadas para hCdc14B mediante siRNAs, presentan menor activación de Chk1 y un *checkpoint* de daño al DNA deficiente (Bassermann et al., 2008). Respecto a esta función de hCdc14B en la activación del *checkpoint* tras daño en el DNA en G2 existe controversia. Estudios realizados en células *knockout* (KO) para hCdc14B, muestran que estas células carentes de la fosfatasa presentan un *checkpoint* de G2 funcional capaz de sensor y arrestar las células antes de la entrada en mitosis. Sin embargo, su capacidad de reparar el daño en el DNA está disminuida, sugiriendo un posible papel en reparación (Mocciaro et al., 2010).

Esta posible función de hCdc14B en reparación de daño en el DNA se ve avalada por las características observadas en ratones KO para Cdc14B en los cuales se observa que aunque son viables y no presentan anomalías obvias, desarrollan signos característicos de edad avanzada como cataratas o cifosis a edades bastante más tempranas que los ratones control, además de resultar menos fértiles, especialmente las hembras. A nivel celular, los MEFS (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) obtenidos de estos ratones, acumulan más daño endógeno en el DNA y un mayor número de células entran en senescencia tras daño exógeno comparado con MEFS tipo silvestre (Wei et al., 2011b). Sin embargo, estos resultados no han

sido corroborados en ratones KO para Cdc14B generados por un grupo independiente (Guillamot et al., 2011).

Se han identificado diferentes sustratos para hCdc14B a través de los cuales podría estar regulando varios procesos celulares, algunos comunes para hCdc14A y anteriormente mencionados. Al igual que hCdc14A, hCdc14B desfosforila al supresor tumoral **p53** (Li et al., 2000), importante en la regulación del ciclo de división de los centrosomas (Tarapore and Fukasawa, 2002; Tarapore et al., 2001); a la NAD desacetilasa **Sirt2** (North and Verdin, 2007b), proteína que participa en la condensación de la cromatina en la transición G2/M y en la regulación de la salida mitosis (Inoue et al., 2007; North and Verdin, 2007b) y a la **RNA polimerasa II** en su región C-terminal inhibiendo la transcripción de proteínas reguladoras del ciclo celular como ciclinas de tipo A y de tipo B por lo que hCdc14B también está implicada en la regulación del ciclo celular a nivel transcripcional (Guillamot et al., 2011).

hCdc14B también desfosforila al coactivador de APC/C, **Cdh1**. Esta desfosforilación permite la activación del complejo APC/C^{Cdh1} con la consiguiente degradación de diferentes proteínas necesaria para la salida de mitosis (Tumurbaatar et al., 2011) y para la activación del *checkpoint* tras daño en el DNA en G2 como ya hemos mencionado (Bassermann et al., 2008).

Otros sustratos descritos para hCdc14B pertenecen a la familia de fosfatasas **hCdc25**. hCdc14B desfosforila a las 3 isoformas de hCdc25 (hCdc25A, hCdc25B y hCdc25C) pudiendo estar implicada en su inactivación o degradación, proceso necesario para la inhibición de los complejos CDK1-ciclina B1 a la salida de mitosis (Tumurbaatar et al., 2011).

También se ha comprobado que hCdc14B desfosforila a **Skp2**, promoviendo su degradación e impidiendo la activación del complejo ubiquitin ligasa SCF^{Skp2}, encargado de la degradación de diversos inhibidores de CDKs, como p27 o p21. De este modo hCdc14B parece estar implicado en la regulación de la duración de la fase G1 (Rodier et al., 2008).

En resumen, las fosfatasas hCdc14 están implicadas en diferentes procesos celulares, entre ellos la regulación del ciclo celular. La isoforma hCdc14A se ha implicado en la regulación del ciclo de duplicación del centrosoma, de la segregación cromosómica y de la citoquinesis, entre otras funciones. La isoforma hCdc14B mantiene la estabilidad del material genético regulando el ciclo de duplicación de los centrosomas (Wu et al., 2008) y participando en la activación del *checkpoint* tras daño en el DNA (Bassermann et al., 2008) así como en el proceso de reparación del daño generado (Mocciaro et al., 2010). Estas funciones de hCdc14A y hCdc14B les otorgan un posible papel como supresores tumorales manteniendo la estabilidad genómica y regulando la correcta repartición del material genético y/o deteniendo el ciclo celular ante daño en el DNA para evitar que estas alteraciones en el material genético se transmitan a las células hijas. Algunas de las funciones descritas para las fosfatasas hCdc14 no han sido estudiadas en detalle y aún se desconocen los mecanismos moleculares a través de los cuales llevan a cabo muchas de ellas. Por todo ello, es importante profundizar en el estudio del papel que juegan estas fosfatasas en células humanas.

PUNTOS DE CONTROL O *CHECKPOINTS*

El ciclo celular debe estar regulado de forma precisa ya que alteraciones en el mismo conducen a proliferación incontrolada e inestabilidad genómica que llevan al desarrollo de diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer.

La correcta progresión por el ciclo celular está controlada por los *checkpoints* o puntos de control, los cuales detectan posibles errores producidos durante diferentes procesos como la replicación del DNA, la segregación cromosómica, así como daños en el material genético producidos en cualquiera de las fases del ciclo. La activación de estos puntos de control conduce a la parada del ciclo celular permitiendo a las células reparar correctamente estas alteraciones, asegurando así que cada etapa del ciclo celular se complete correctamente antes de continuar con la siguiente, y evitando que dichas alteraciones se transmitan a las células hijas (Malumbres and Barbacid, 2009).

I. **CHECKPOINT DEL ENSAMBLAJE DEL HUSO MITÓTICO**

El *checkpoint* del ensamblaje del huso mitótico (SAC) asegura la correcta segregación de las cromátidas hermanas inhibiendo la transición de metafase a anafase hasta que todos los cromosomas están unidos de forma bipolar al huso mitótico (Malumbres and Barbacid, 2009).

El SAC se activa desde el inicio de la mitosis debido a la presencia de cinetocoros no unidos a microtúbulos o unidos de forma incorrecta. En este punto del ciclo se reclutan hacia el cinetocoro externo diferentes proteínas como KNL1 (*Kinetochores Null Protein 1*) y los complejos NDC80/HEC1 (*Nuclear Division Cycle 80*) y MIS12 (*MISsegregation 12*). Estas proteínas regulan las uniones de los cinetocoros a los microtúbulos del huso mitótico y sirven de plataforma para el reclutamiento de las proteínas del SAC (Cheeseman et al., 2006; Petrovic et al., 2010; Screpanti et al., 2011; Wei et al., 2007). Entre las proteínas del SAC se encuentran las serina treonina quinasas MPS1 (*Monopolar Spindle Protein 1*) y BUB1 (*Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1*), la pseudo-quinasa BUBR1 (*BUB1-Related 1*) y otros componentes como MAD1 (*Mitotic Arrest Deficient 1*), MAD2 y BUB3 (Musacchio and Salmon, 2007). La quinasa MPS1 es necesaria para el reclutamiento de los otros componentes del SAC hacia los cinetocoros. MPS1 fosforila a KNL1 creando sitios de unión para BUB1, que a su vez facilita el reclutamiento de BUB3, BUBR1 y MAD1 (Yamagishi et al., 2012). MAD1 interacciona con MAD2, catalizando su activación y consecuentemente la del propio *checkpoint*. Las proteínas MAD2, BUBR1 y BUB3 forman el denominado complejo del *checkpoint* de mitosis (*MCC*, *Mitotic Checkpoint Complex*) que se une a Cdc20 impidiendo la activación del complejo APC/C^{Cdc20}, responsable de la poliubiquitinación de securina y ciclina B1 (Foe et al., 2011; Sudakin et al., 2001). Esto permite prolongar la prometáfase hasta que todos los cromosomas están unidos mediante orientación bipolar a los microtúbulos del huso mitótico (Musacchio and Salmon, 2007).

La función de las proteínas del SAC resulta de suma importancia, de modo que alteraciones en las mismas, incrementan la inestabilidad cromosómica que predispone al desarrollo de tumores. En ratones, la inactivación parcial de BUB1, BUBR1 o MAD2 lleva a inestabilidad cromosómica e incremento en la susceptibilidad a tumores (Baker et al., 2004; Jeganathan et al., 2007; Michel et al., 2001). En humanos, solo se han descrito unos pocos síndromes caracterizados por inestabilidad cromosómica, como el síndrome de aneuploidía en mosaico variegada (*MVA, Mosaic Variegated Aneuploidy*) y el síndrome de separación prematura de las cromátidas (*PCS, Premature Chromatid Separation*). Estos síndromes se producen como consecuencia de mutaciones inactivantes en BUBR1 que contribuyen al desarrollo de tumores (Hanks et al., 2004; Kops et al., 2005; Mantel et al., 2007). El hecho de que no se hayan descrito más síndromes de este tipo se debe probablemente a que la inestabilidad cromosómica producida por la falta de las proteínas del SAC lleva a la muerte de los embriones en los primeros estadios del desarrollo (Mantel et al., 2007).

Existen además otras proteínas adicionales que regulan la actividad del SAC entre las que se encuentran quinasas como Aurora B, MAPK, CDK1-ciclina B1, NEK2 y PLK1 (Chung and Chen, 2003; Karess, 2005; Mao et al., 2005; van Vugt and Medema, 2005). La quinasa Aurora B promueve el reclutamiento hacia el cinetocoro de las diferentes proteínas del SAC y también se encarga de desestabilizar y eliminar las uniones cinetocoro-microtúbulo incorrectas (Lampson and Cheeseman, 2011; Welburn et al., 2010). Al inicio de mitosis, Aurora B se localiza en los centrómeros de los cromosomas cercana a sus sustratos en el cinetocoro externo, donde fosforila a NDC80, KNL1, DSN1 (miembro del complejo MIS12) y CENP-U, impidiendo su interacción con los microtúbulos (Figura I-6, 1) (Hua et al., 2011; Welburn et al., 2010). También favorece el reclutamiento hacia los cinetocoros de las proteínas CENP-E y dineína (Ditchfield et al., 2003; Kasuboski et al., 2011; Lin et al., 2006). Estas proteínas son capaces de unirse a los laterales de los microtúbulos produciendo cierta tensión, la cual incrementa la distancia entre la Aurora B centromérica y las proteínas de los cinetocoros externos (KNL1, complejo MIS12 y complejo NDC80) dando como resultado un descenso en la fosforilación de estas proteínas. Esto es debido también a la presencia de PP2A-B56 en los cinetocoros externos, la cual es responsable de su desfosforilación permitiendo así la unión de estas proteínas a los microtúbulos (Figura I-6, 2) (Magidson et al., 2011; Welburn et al., 2010). Concretamente, las proteínas NDC80 y NUF2 (del complejo NDC80/HEC1) y KNL1 se unen mediante sus dominios globulares a los extremos de los microtúbulos (Figura I-6, 3) (Cheeseman et al., 2006; Wei et al., 2007). A medida que se van uniendo correctamente a los microtúbulos, aumenta la tensión intercinetocórica y se reduce la accesibilidad de Aurora B hacia los sustratos de los cinetocoros, al mismo tiempo que PP2A-B56 es eliminada de los cinetocoros. Estos dos eventos, junto con el reclutamiento de PP1 hacia estos cinetocoros unidos, aseguran que los niveles de fosforilación por Aurora B se mantengan bajos y las uniones bipolares se establezcan (Figura I-6, 4) (Maresca and Salmon, 2009).

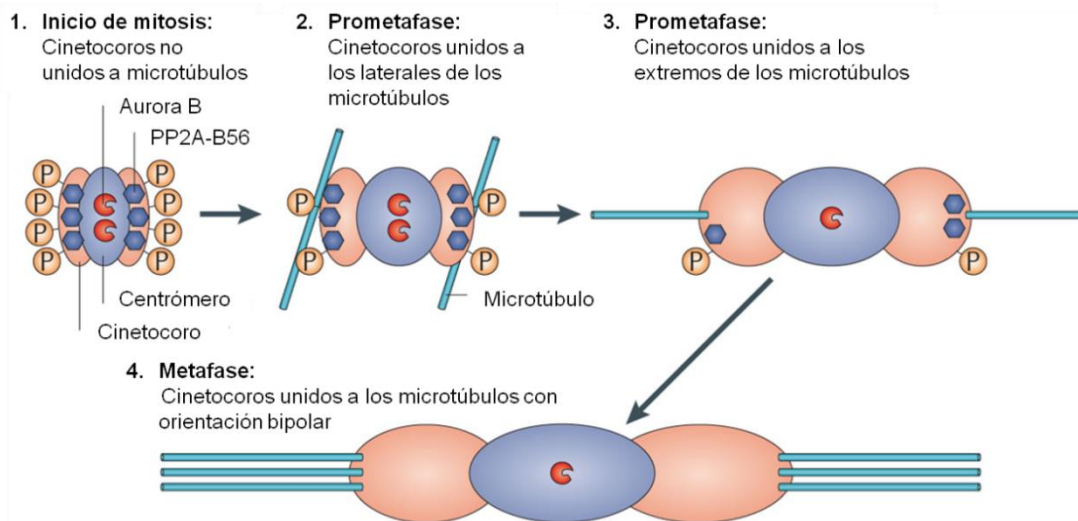


Figura I-6. Modelo de regulación de las uniones cinetocoro-microtúbulo a través de procesos de fosforilación/desfosforilación por Aurora B y PP2A-B56. En los cinetocoros no unidos a microtúbulos, la quinasa Aurora B centromérica está cerca de sus sustratos del cinetocoro externo, por lo que la fosforilación sobre ellos es alta, a pesar de la presencia de la fosfatasa PP2A-B56 (1). Durante prometafase, se producen interacciones laterales entre proteínas del cinetocoro con los microtúbulos, las cuales producen cierta tensión intercinetocórica. Esto incrementa la distancia entre Aurora B y sus sustratos, mientras que la localización de PP2A-B56 se mantiene inalterada (2). Como resultado, se produce un descenso en la fosforilación de las proteínas cinetocóricas, permitiendo la formación y estabilización de uniones con los extremos de los microtúbulos (3). En metafase, la unión de todos los cinetocoros a microtúbulos, mediante orientación bipolar, incrementa la tensión en la región cinetocórica, limitando aún más el acceso de Aurora B a sus sustratos, permitiendo así la formación de uniones estables (4). Adaptado de Foley and Kapoor, 2013.

Una vez que todos los cromosomas están unidos de forma bipolar al huso mitótico se produce la inactivación del SAC. La extinción del SAC en *Saccharomyces cerevisiae* parece depender, al menos en parte, de las fosfatasas Cdc14 y PP1. Cdc14, a través de la desfosforilación de INCENP en anafase, media la disociación de Aurora B de los centrómeros y su localización en la zona media del huso mitótico, previniendo la reactivación del SAC (Mirchenko and Uhlmann, 2010). La inactivación del SAC también depende en parte del reclutamiento de PP1 hacia los cinetocoros a través de su unión a la secuencia RVXF en KNL1. En metazoa, se desconoce el mecanismo exacto de inactivación del SAC. La mutación en el motivo RVXF de KNL1 es letal y afecta al mantenimiento de la estabilidad de las uniones cinetocoro-microtúbulo, pero se desconoce si también participa en el silenciamiento del SAC (Funabiki and Wynne, 2013; Liu et al., 2010a). La identificación de sustratos de PP1 es necesaria para entender su posible papel en el silenciamiento del SAC, entre los cuales los sitios de fosforilación en KNL1 por MPS1 son potenciales candidatos (Foley and Kapoor, 2013). Finalmente, la inactivación del SAC lleva a la liberación de Cdc20 de sus inhibidores MAD2, BUB3 y BUBR1 para activar el complejo APC (Mansfeld et al., 2011; Uzunova et al., 2012). Una vez activo el complejo APC^{Cdc20}, este poliubiquitina a ciclina B1 y securina para su posterior degradación. La degradación de securina permite la activación de separasa que elimina los complejos de cohesina entre las cromátidas hermanas permitiendo su segregación. La degradación de ciclina B1 lleva a la inactivación de los complejos CDK1-ciclina B1,

permitiendo la progresión por las etapas finales de la mitosis (Figura I-7) (Chung and Chen, 2003; D'Angiolella et al., 2003; Musacchio and Salmon, 2007; Tang et al., 2004).

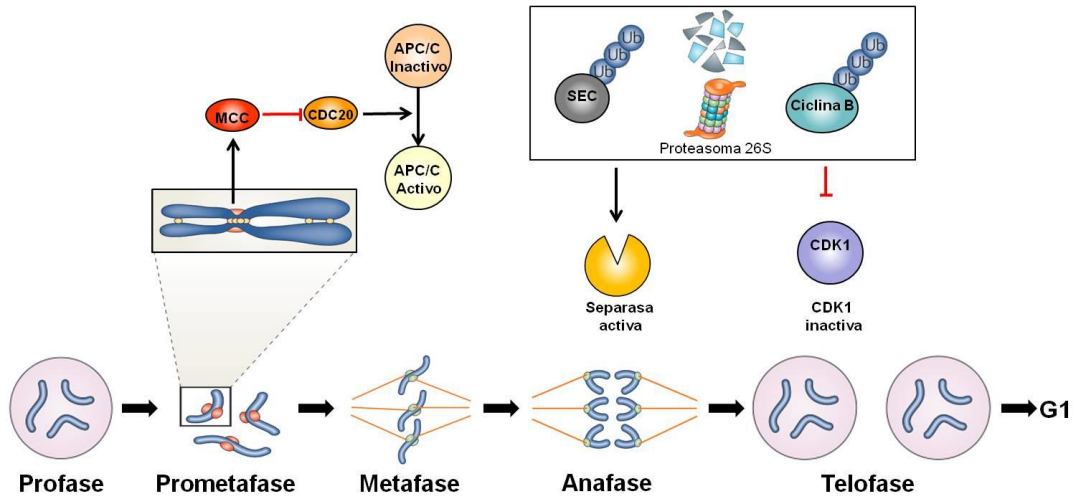


Figura I-7. Función del SAC. Al inicio de mitosis, la presencia de cinetocoros no unidos a microtúbulos (círculos rojos) favorece la formación del complejo MCC, que impide la unión de Cdc20 al complejo APC/C, evitando así la activación de este complejo. La unión de los cromosomas a los microtúbulos del huso mitótico con orientación bipolar lleva a la inactivación del SAC. Se produce entonces la activación del complejo APC/C^{Cdc20}, que poliubiquitina a ciclina B1 y securina para su posterior degradación. La degradación de securina permite la activación de la separasa que elimina los complejos de cohesina entre las cromátidas hermanas permitiendo su separación. La degradación de ciclina B1 tiene como consecuencia la disminución de la actividad CDK1-ciclina B1, necesaria para la salida de mitosis. Adaptado de Musacchio and Salmon, 2007.

En la regulación del *checkpoint* del ensamblaje del huso mitótico participan diferentes quinasas y fosfatasa (Funabiki and Wynne, 2013). Entre las quinasas se encuentran **Aurora B**, con funciones muy importantes tanto en reclutar las proteínas del SAC como en detectar y desestabilizar las uniones incorrectas entre cinetocoros y microtúbulos; **NEK2**, que también participa en la desestabilización de las uniones incorrectas entre cinetocoros y microtúbulos junto con Aurora B (Wei et al., 2011a); las quinasas del SAC **MPS1**, **BUB1** y **BUBR1**, que median el reclutamiento de otras proteínas participantes en el SAC (Hewitt et al., 2010; Johnson et al., 2004; Maciejowski et al., 2010), y en el caso de **BUB1** también favorece el reclutamiento de Aurora B hacia los centrómeros (Kawashima et al., 2010). **PLK1**, facilita el reclutamiento de PP2A-B56 para contrarrestar las fosforilaciones mediadas por Aurora B y estabilizar las uniones cinetocoro-microtúbulo (Suijkerbuijk et al., 2012). Igualmente, también participan las quinasas **CDK1** y **MAPKs**, cuyas fosforilaciones sobre Cdc20 favorecen la unión de esta proteína a MAD2 impidiendo su unión con APC (D'Angiolella et al., 2003; Labit et al., 2012), y favorecen el reclutamiento y activación de algunas de las proteínas del SAC en el caso de las MAPKs (Zhao and Chen, 2006). De igual modo, las fosfatasa presentan una función muy importante regulando este punto de control. Entre ellas, destacar hasta el momento a **PP2A-B56** que desfosforila proteínas del cinetocoro, favoreciendo las correctas uniones entre los cinetocoros y los microtúbulos (Suijkerbuijk et al., 2012), mientras que **PP1** participa en el mantenimiento de las correctas uniones cinetocoro-microtúbulo y, posiblemente, en el silenciamiento del SAC (Liu et al., 2010b; Vanoosthuysse and Hardwick, 2009).

II. CHECKPOINT DE DAÑO EN EL DNA

El *checkpoint* de daño en el DNA se activa ante la presencia de lesiones en el material genético las cuales pueden producirse tanto por procesos celulares endógenos como debido a agentes externos. Entre los tipos de daño producidos por procesos celulares endógenos se encuentran la sustitución de un nucleótido por otro debido a errores en el proceso de replicación; la metilación, desaminación o pérdida de bases nitrogenadas (depuración o depirimidinación) o el daño oxidativo en el DNA causado por especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), producidas en el propio metabolismo celular, que actúan reaccionando con las bases nitrogenadas y provocando la rotura de una o ambas cadenas del DNA. Los daños causados por agentes exógenos son muy diversos. Entre ellos se encuentran la rotura de una o ambas cadenas del DNA, producidas por radiaciones ionizantes (rayos X o rayos γ); la dimerización de pirimidinas adyacentes en la misma cadena o en diferentes cadenas del DNA, producida por radiación ultravioleta (UV); las roturas de cadena sencilla o de doble cadena en el DNA producidos por inhibidores de la topoisomerasa I y II como camptotecina o doxorrubicina, entre otros; así como diferentes modificaciones de las bases nitrogenadas, producidas por diferentes agentes químicos como el MMS (*Methyl Metane-Sulfonate*), DES (*DiEthyl Sulfate*) y DEB (*DiEpoxyButane*), entre otros muchos.

Para evitar este tipo de alteraciones, las células eucariotas han desarrollado una compleja y coordinada red de señalización, conocida como “Respuesta a daño en el DNA” (*DDR, DNA Damage Response*), la cual sensa las lesiones en el DNA, activa los mecanismos de *checkpoints* o control del ciclo celular para detener transitoriamente la proliferación, y repara el daño. Dependiendo de la extensión del daño, las células deciden entre reparar todas las lesiones y volver a entrar en el ciclo celular, o ser eliminadas mediante muerte celular programada (apoptosis). Alternativamente, las células pueden permanecer arrestadas en un punto del ciclo, proceso denominado Senescencia (Medema and Macurek, 2012).

El daño en el DNA puede ocurrir en cualquier fase del ciclo celular. Por lo tanto, el *checkpoint* de daño según cuando se active puede provocar la parada del ciclo celular en G1/S para evitar la replicación del DNA dañado, dentro de la fase S cuando el daño se produce mientras se replica el DNA o en G2/M para prevenir la segregación de los cromosomas que presentan daño (Kastan and Bartek, 2004). Las células activan diferentes vías de señalización en respuesta a lesiones en el DNA dependiendo, del tipo de daño generado y de la fase en la que se produce este.

De entre los diferentes tipos de daño que pueden sufrir las células, las roturas de doble cadena en el DNA (*DSBs, Double Strand Breaks*) son uno de los daños más letales ya que pueden conducir a la pérdida de material genético, lo que favorece la carcinogénesis (Vilenchik and Knudson, 2003). Las DSBs pueden ser generadas tanto por procesos celulares endógenos como la recombinación para la generación de diversidad de receptores en linfocitos e inmunoglobulinas (Chaudhuri et al., 2007), el proceso de recombinación meiótica (Cole et al.,

2010) o el estrés oxidativo derivado del propio metabolismo (Hoeijmakers, 2009), como por agentes exógenos como la radiación ionizante que produce ROS (Lieber et al., 2003) o a través del uso de agentes quimioterápicos que actúan, por ejemplo, bloqueando la actividad de las enzimas topoisomerasa I y II (McClendon and Osherooff, 2007; Shrivastav et al., 2008).

1. Activación del *checkpoint*

La activación del *checkpoint* es un mecanismo complejo que se inicia con el reconocimiento del daño en el DNA mediante proteínas sensoras, encargadas de detectar el sitio donde se ha producido la lesión, seguido del reclutamiento de proteínas mediadoras, que funcionan como adaptadoras, ayudando a reclutar diferentes proteínas de la respuesta a daño. A continuación, se produce la activación de proteínas transductoras, las cuales regulan la actividad de diferentes proteínas participantes en la respuesta a daño en el DNA. Por último, tiene lugar la activación de proteínas efectoras, encargadas de desencadenar la parada del ciclo celular para permitir la reparación del daño generado, o en otros casos, conducir a senescencia o apoptosis (Medema and Macurek, 2012).

1.1 Activación de las proteínas sensoras

Las proteínas sensoras son las encargadas de reconocer el daño en el DNA. En el caso de las DSBs, este reconocimiento es llevado a cabo por el complejo MRN (*Mre11-Rad50-Nbs1*) que se une directamente a los extremos expuestos del DNA a través de la nucleasa dependiente de Mn^{2+} , Mre11, y de la ATPasa, Rad50 (Falck et al., 2005). La quinasa ATM (*Ataxia Teleangiectasia Mutated kinase*) también es reclutada rápidamente a los sitios de daño uniéndose inicialmente de forma directa al DNA y asociándose posteriormente al complejo MRN. La activación inicial de ATM requiere de acetilación por Tip60 (Sun et al., 2007), siendo necesaria una posterior autofosforilación en los residuos Ser¹⁹⁸¹, Ser³⁶⁷ y Ser¹⁸⁹³ para su completa activación (Figura I-8) (Bakkenist and Kastan, 2003; Kozlov et al., 2006).

Se ha descrito que las DSBs son procesadas durante las fases S y G2 del ciclo por la endonucleasa CtIP, generando DNA de cadena sencilla (*ssDNA*, *single-stranded DNA*) que lleva a una activación secundaria de la quinasa ATR (*ATM-and Rad53-related kinase*) (Jazayeri et al., 2006). La endonucleasa CtIP inicia el procesamiento de los extremos de las DSBs, mientras que la posterior resección es llevada a cabo por la exonucleasa Exo1, cuya actividad se ve incrementada tras fosforilación por ATM (Bolderson et al., 2010). El procesamiento de estos extremos lleva a la formación de *ssDNA* que es rápidamente recubierto por los complejos proteicos RPA (*Replication Protein A*), los cuales reclutan y activan a la quinasa ATR en un complejo estable con su cofactor ATRIP (Zou and Elledge, 2003). Para la completa activación de ATR son necesarias la proteína adaptadora TopB1, la proteína RHINO y el complejo trimérico Rad9-Hus1-Rad1 (complejo 9-1-1) (Figura I-8) (Cotta-Ramusino et al., 2011).

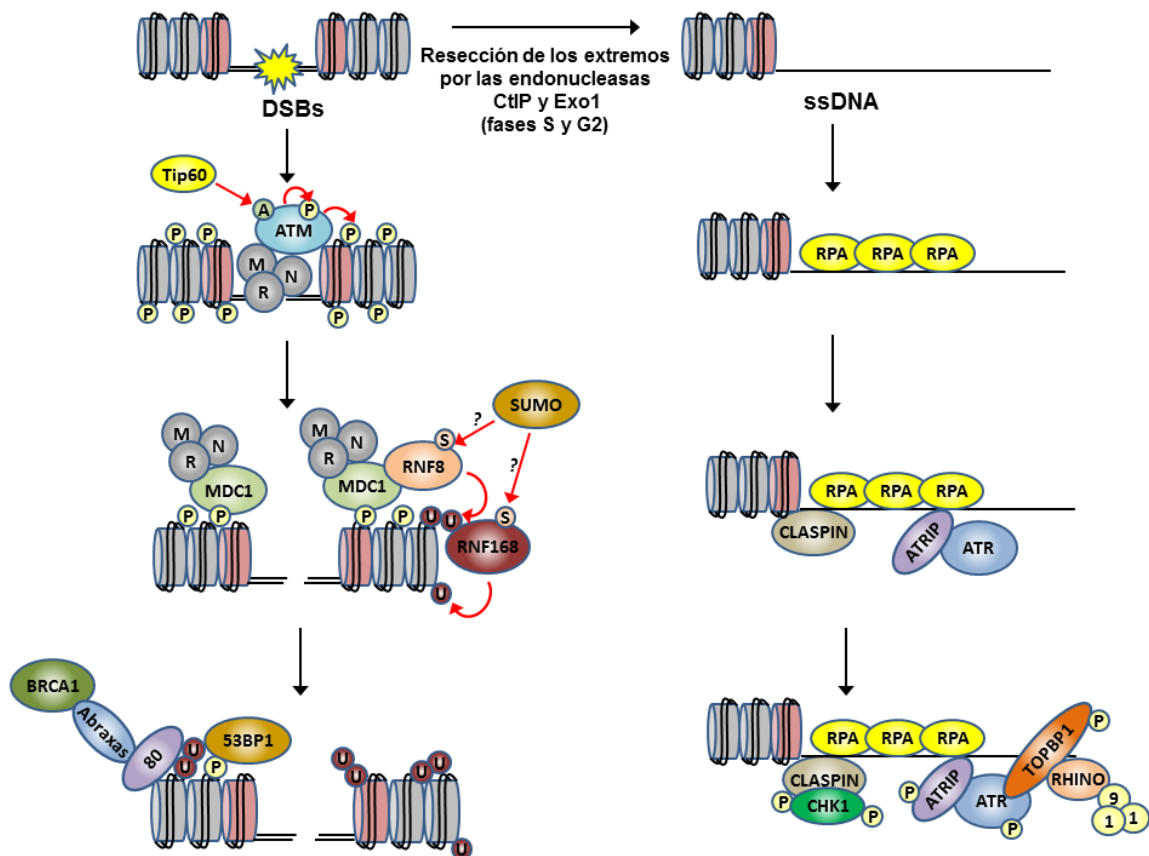


Figura I-8. Activación de proteínas sensoras del daño y reclutamiento de mediadores. Las roturas de doble cadena en el DNA son reconocidas por el complejo MRN que promueve el reclutamiento y la activación de ATM. La activación inicial de ATM requiere de acetilación por Tip60, siendo necesaria una posterior autofosforilación para su completa activación. ATM fosforila el residuo Ser¹³⁹ de H2AX, generando señales reconocidas por la proteína mediadora MDC1, la cual actúa de anclaje atrayendo hacia la cromatina diferentes enzimas entre las que se encuentran las ubiquitin ligasas RNF8 y RNF168. Estas ubiquitinan a las histonas H2A y H2AX, promoviendo así el reclutamiento de las proteínas 53BP1 y BRCA1. La participación de SUMO ligasas también parece importante para el reclutamiento de 53BP1 y BRCA1. Durante las fases S y G2 del ciclo celular las DSBs son procesadas por las endonucleasas CtIP y Exo1, generando DNA de cadena sencilla (ssDNA) que es recubierto por los complejos RPA, los cuales reclutan y activan a la quinasa ATR en un complejo estable con su cofactor ATRIP. Para la completa activación de ATR son necesarias las proteínas TopBP1, RHINO y el complejo trimérico 9-1-1. Modificado de Ciccia and Elledge, 2010.

1.2 Reclutamiento de las proteínas mediadoras

Las proteínas mediadoras funcionan como adaptadoras, ayudando a reclutar diferentes proteínas participantes en la respuesta a daño en el DNA. Una de estas es MDC1 (*Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1*), que reconoce el residuo Ser¹³⁹ de H2AX fosforilado por ATM, fosforilación que se conoce como γ H2AX, y es considerada como marcador de daño (Medema and Macurek, 2012). El reclutamiento de MDC1 conlleva una mayor acumulación del complejo MRN, por interacción directa de MDC1 y NBS1 (Chapman and Jackson, 2008), y de ATM (Lou et al., 2006), expandiendo la cantidad de γ H2AX a lo largo de la cromatina (Meyer et al., 2013). También se produce el reclutamiento de la ubiquitin ligasa RNF8 mediante interacción directa con MDC1. Esta ubiquitin ligasa inicia una compleja cascada de

ubiquitinación sobre las histonas H2A y H2AX que origina cambios en la estructura de la cromatina, asociados con la generación de sitios de unión para diferentes proteínas, entre las que se encuentran la ubiquitin ligasa RNF168 (Huen et al., 2007; Mailand et al., 2007). Esta enzima se une a través de sus motivos de interacción con ubiquitinas (*MIUs, Motifs Interacting with Ubiquitin*) a las formas ubiquitinadas de las histonas H2A y H2AX, aumentando sus niveles de ubiquitinación y promoviendo el reclutamiento de las proteínas 53BP1 y BRCA1 (Doil et al., 2009). Para el reclutamiento de las diferentes proteínas y la formación de los focos de daño también parece ser importante la modificación por sumoilación de determinadas proteínas. Aunque no se conoce la función exacta de esta modificación, es posible que la sumoilación de las ubiquitin ligasas RNF8 y RNF168 regule la actividad de estas enzimas y/o su asociación con otros componentes de la DDR. De este modo, se ha visto que las SUMO ligasas PIAS1 y PIAS4 son importantes en el reclutamiento de BRCA1 y 53BP1, respectivamente, y tanto SUMO1 como SUMO2/3 se acumulan en los focos de daño (Galanty et al., 2009; Morris et al., 2009). Las proteínas BRCA1 y 53BP1 no tienen actividad enzimática, siendo su función principal facilitar la señalización entre las proteínas sensoras del daño y las proteínas transductoras (Figura I-8) (Bekker-Jensen and Mailand, 2010; Ciccia and Elledge, 2010; Medema and Macurek, 2012).

1.3 Activación de las proteínas transductoras

Las quinasas Chk1 y Chk2 actúan como proteínas transductoras, fosforilando una gran variedad de proteínas que participan en la DDR, regulando su actividad. Aunque pueden tener funciones redundantes, su principal diferencia radica en que Chk2 es activada por ATM en respuesta a DSBs, mientras que Chk1 es principalmente activada por ATR en respuesta a ssDNA (Smith et al., 2010).

Chk1, para ser activada por ATR, debe estar formando un complejo con una proteína mediadora denominada Claspin (Liu et al., 2006). ATR fosforila a Chk1 en los residuos Ser³¹⁷ y Ser³⁴⁵, fosforilaciones que a su vez promueven la autofosforilación de Chk1 en el residuo Ser²⁹⁶ (Kasahara et al., 2010). Estas fosforilaciones promovidas por ATR no aumentan la actividad de Chk1 *per se* pero sí permiten que esta quinasa sea liberada desde la cromatina y difunda libremente por el núcleo, fosforilando diversas proteínas como las fosfatasas hCdc25 y quinasas como Wee1 y Nek11 (Figura I-9) (Forrest and Gabrielli, 2001; Jin et al., 2008; Melixetian et al., 2009; Rothblum-Oviatt et al., 2001).

Chk2 se encuentra como monómero inactivo y una vez que se produce daño en el DNA es fosforilada en el residuo Thr⁶⁸ por ATM pasando de monómero inactivo a dímero. Para su completa activación, debe producirse la fosforilación en *trans* de las treoninas 383 y 387 (Stolz et al., 2011). Una vez activa, se localiza en el nucleoplasma donde fosforila diversas proteínas entre las que se encuentran los factores de transcripción p53 y EF21, las fosfatasas hCdc25 y la proteína BRCA1 (Figura I-9) (Falck et al., 2001; Forrest and Gabrielli, 2001; Takai et al., 2002).

1.4 Función de las proteínas efectoras

Las proteínas efectoras son las encargadas de regular la actividad CDK, desencadenando la parada del ciclo para permitir la reparación del daño generado. La actividad CDK, que regula la transición entre las diferentes fases del ciclo, es inhibida por fosforilación en los residuos Thr¹⁴ y Tyr¹⁵ por las quinasas Wee1 y Myt1, mientras que su activación está regulada por desfosforilación de dichos residuos por las fosfatasas hCdc25. La parada del ciclo celular que se produce tras daño en el DNA está en parte mediada por la inhibición de la actividad de las fosfatasas hCdc25, de tal forma que tras daño en el DNA, se produce un aumento en la fosforilación inhibitoria de Tyr¹⁵ sobre CDK2 o CDK1, causando como resultado una parada del ciclo en G1 o G2 respectivamente (Mailand et al., 2000). La degradación de hCdc25A es inducida por la fosforilación por Chk1 en varios residuos, conduciendo a la posterior ubiquitinación por el complejo SCF- β -TrCP y consecuente degradación por el proteasoma (Jin et al., 2008; Melixetian et al., 2009). La vía ATM-Chk2 también se ha implicado en la degradación de hCdc25A (Falck et al., 2001). Las isoformas hCdc25B y hCdc25C son fosforiladas por ambas quinasas, Chk1 y Chk2, y estas fosforilaciones llevan a su inactivación a través de su unión a proteínas de la familia 14-3-3 (Figura I-9) (Forrest and Gabrielli, 2001). Chk1 también fosforila a la quinasa Wee1 promoviendo su asociación con proteínas 14-3-3 lo que conduce a un incremento en su actividad catalítica (Figura I-9) (Reinhardt and Yaffe, 2009; Rothblum-Oviatt et al., 2001).

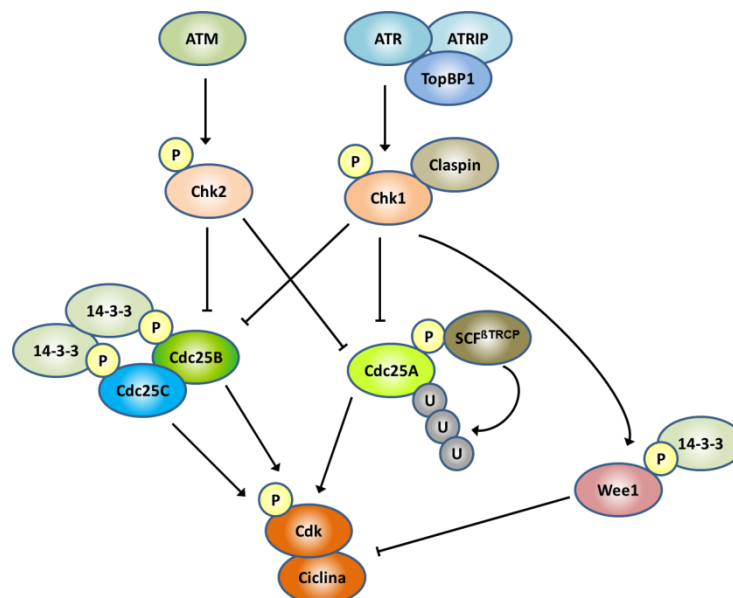


Figura I-9. Funciones de las proteínas efectoras en la parada del ciclo celular. La activación de las quinasas Chk1 y Chk2 conduce a la degradación de hCdc25A y secuestro de hCdc25B y hCdc25C por unión a proteínas 14-3-3. Igualmente promueven un incremento en la actividad catalítica de Wee1. Como consecuencia, se inhibe la actividad de los complejos CDK, impidiendo la transición hacia la siguiente fase del ciclo para dar tiempo a que las células reparen el daño generado. Adaptado de Reinhardt and Yaffe, 2009.

La fosfatasa hCdc14B, proteína de estudio en este trabajo, también se ha implicado en la activación de este *checkpoint* en respuesta a roturas de doble cadena en el DNA en fase G2. En esta situación, Chk1 se localiza en el nucléolo donde fosforila a hCdc14B, favoreciendo su traslocación al nucleoplasma (Peddibhotla et al., 2011). Una vez en el nucleoplasma, hCdc14B desfosforila y activa al complejo APC/C^{Cdh1} que marca para su degradación a la quinasa mitótica PLK1. La degradación de PLK1 induce estabilización de Claspin, proteína necesaria para la completa activación de Chk1, y de Wee1, quinasa inhibidora de los complejos CDK. Como consecuencia, se produce inhibición de la entrada en mitosis (Bassermann et al., 2008).

2. Mantenimiento del *checkpoint*

Una respuesta apropiada frente a daño en el DNA necesita ser rápida para prevenir la transición a la siguiente fase en el ciclo, proceso que depende de la transmisión de la señal mediante fosforilación de múltiples sustratos por las quinasas ATM/ATR y Chk1/Chk2, pero igualmente debe ser perdurable para permitir una eficiente reparación del DNA, la cual incluye la activación de vías que requieren cambios en la transcripción de determinados genes.

Uno de los ejemplos más estudiados del mantenimiento del *checkpoint* es la regulación por parte del supresor tumoral p53 de la transcripción de p21. p53 presenta múltiples modificaciones postraduccionales, especialmente en su dominio N-terminal que incluyen fosforilación de Ser¹⁵ y Ser²⁰ por ATM/ATR/DNA-PK y Chk1/Chk2 respectivamente, y también en su dominio C-terminal, incluyendo acetilación de Lys382 y Lys320 por CBP/p300 y PCAF respectivamente. Estas modificaciones actúan reduciendo la afinidad de p53 por su regulador negativo Mdm2, permitiendo de este modo la estabilización y tetramerización de p53, su asociación a coactivadores o correpresores y su consecuente unión a promotores de numerosos genes diana. Uno de estos genes es p21, cuya proteína se une e inhibe los complejos CDK2-ciclina E y CDK2-ciclina A, teniendo un papel fundamental en el control del arresto en fase G1 (Dai and Gu, 2010).

El mantenimiento del *checkpoint* a largo plazo depende principalmente de la vía de p53 en G1. Existen otras rutas críticas para el mantenimiento de la respuesta en G2 como es la vía p38/MK2 (Reinhardt et al., 2010). Mediante esta vía se activa una cascada de señalización que conduce a la fosforilación de hCdc25B/hCdc25C y su secuestro citosólico mediante su unión a proteínas 14-3-3, inhibiendo así la activación de los complejos CDK1-ciclina B1 y previniendo la prematura entrada en mitosis (Reinhardt et al., 2010). El mantenimiento del *checkpoint* de G2 también está determinado por p53, por una vía independiente de p21, a través de la represión de la transcripción de proteínas inductoras de mitosis como ciclina B1, hCdc25B y PLK1 (Dalvai et al., 2011; McKenzie et al., 2010).

3. Silenciamiento del *checkpoint*

La finalidad del *checkpoint* de daño en el DNA es detener el ciclo en la fase en la que se ha producido el daño para permitir la eficiente reparación del daño generado. Una vez que la reparación concluye con éxito, el *checkpoint* se silencia y las células vuelven a entrar en el ciclo celular. El silenciamiento del *checkpoint* y la reentrada de las células en el ciclo dependen de varios mecanismos.

Uno de estos mecanismos está mediado por la función de la quinasa PLK1. PLK1 marca a Claspin y Wee1 para su degradación (Mailand et al., 2006), promueve la traslocación nuclear de las fosfatasa hCdc25B y hCdc25C y fosforila a Chk2 previniendo su dimerización y activación (van Vugt et al., 2010). De este modo, PLK1 impide la activación de ambas quinasas Chk1 y Chk2 y contribuye a la activación de los complejos CDK-ciclina. PLK1 también fosforila a Mdm2, contribuyendo a la inhibición de p53 para la recuperación del *checkpoint*. Sin embargo, la actividad de esta quinasa es esencial pero no suficiente para el proceso de recuperación, indicando que existen mecanismos adicionales (Liu et al., 2010b).

Otro de los mecanismos de silenciamiento del *checkpoint* consiste en revertir las principales modificaciones postraduccionales que se producen durante la respuesta a daño en el DNA, como las fosforilaciones y las ubiquitinaciones, entre otros. Participan diferentes fosfatasa como PP1, PP2A, PP4, PP5, PP6 y WIP1, encargadas de desfosforilar diferentes proteínas del *checkpoint* como γ H2AX, Chk1, Chk2, y p53, entre otras (Chowdhury et al., 2005; Moon et al., 2010; Nakada et al., 2008). De igual modo, participan enzimas desubiquitinadoras como USP3, BRCC36 y OTUB1, que actúan contrarrestando la acción de las ubiquitinasa RNF8 y RNF168 (Nicassio et al., 2007).

4. Adaptación del *checkpoint*

Una vez que se ha reparado el daño en el DNA, las células pueden progresar de nuevo por el ciclo. Sin embargo, datos obtenidos en *Saccharomyces cerevisiae* y *Xenopus laevis* sugieren la existencia de una ruta alternativa para progresar de nuevo por el ciclo en presencia de daño no reparado denominada adaptación del *checkpoint* (Yoo et al., 2004). Este proceso de adaptación también ocurre en células humanas, constituyendo un ejemplo las células cancerosas, las cuales son capaces de silenciar el *checkpoint* para permitir la entrada en mitosis en presencia de daño y llevar a cabo varios ciclos de división celular antes de morir, por ejemplo, por exposición a radiación ionizante (Syljuasen et al., 2006).

Este mecanismo de adaptación puede resultar beneficioso para la supervivencia de organismos unicelulares, ya que permite que la célula escape del arresto y continúe con su ciclo normal aunque presente lesiones no reparadas (Bartek and Lukas, 2007), pero puede ser gravemente perjudicial para organismos multicelulares puesto que la división de células con daño en el DNA incrementa el riesgo de inestabilidad genómica y desarrollo de cáncer (Syljuasen, 2007).

El adecuado funcionamiento de la respuesta a daño en el DNA es muy importante para mantener la integridad del genoma. Si no funciona correctamente se produce acumulación de alteraciones en el DNA que pueden desencadenar inestabilidad genómica, conduciendo al posible desarrollo de tumores (Malumbres and Barbacid, 2009). Así, mutaciones en varios de los genes que codifican para proteínas participantes del *checkpoint* predisponen hacia el desarrollo de síndromes específicos como Ataxia-Telangiectasia o Síndrome de *Louis Bar* (mutaciones en ATM), Síndrome de *Seckel* (mutaciones en ATR) y Síndrome de *Li-Fraumeni* (mutaciones en p53) (Caldecott, 2008; Cimprich and Cortez, 2008; Lavin, 2008), cuyos síntomas incluyen neurodegeneración, predisposición al cáncer e inestabilidad del genoma (Bartkova et al., 2005; Bartkova et al., 2006; Gorgoulis et al., 2005).

REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL DNA

La respuesta a daño en el DNA implica tanto la activación del *checkpoint* como la reparación del daño generado. Ambos procesos deben funcionar correctamente y deben estar coordinados de forma precisa (Curtin, 2012). Muchas de las proteínas participantes en las diferentes vías de reparación aparecen mutadas en diferentes tipos de cáncer indicando la importancia de un correcto funcionamiento de estas vías. Entre ellas se encuentran mutaciones en las proteínas MSH2 y MLH1, participantes en la vía de reparación de apareamientos erróneos, frecuentes en cáncer colorrectal, de estómago, de ovario y del endometrio (Umar et al., 2004); mutaciones en las proteínas Ku70 y Ku80, participantes en la reparación por unión de extremos no homólogos, cuyo silenciamiento es frecuente en cáncer colorrectal y de pulmón (Lee et al., 2007; Willems et al., 2008) o mutaciones en la proteína BRCA2, participante en la reparación por recombinación homóloga, cuyas mutaciones son frecuentes en diferentes tipos de cáncer como cáncer de mama, de ovario, de próstata, de páncreas y melanoma (Berman et al., 1996).

Dependiendo del tipo de daño que se produce en el DNA así como de la fase del ciclo en la que ocurre, las células utilizan diferentes mecanismos para la reparación de las lesiones generadas.

Para la reparación de roturas de doble cadena en el DNA, lesiones altamente tóxicas para las células, se han descrito clásicamente dos vías principales de reparación que consisten en la reparación por unión de extremos no homólogos y la reparación por recombinación homóloga (Ciccia and Elledge, 2010).

I. REPARACIÓN POR UNIÓN DE EXTREMOS NO HOMÓLOGOS

La reparación por unión de extremos no homólogos (*NHEJ*, *Non Homologous End Joining*), aunque puede ocurrir en cualquier etapa del ciclo celular, es la vía de reparación predominante en G1 ya que durante las fases S y G2 del ciclo celular la elevada actividad CDK favorece la reparación por recombinación homóloga (Enserink et al., 2009; Lieber et al., 2010; Shrivastav et al., 2008).

En esta vía de reparación, las proteínas Ku70/Ku80 y la quinasa DNA-PK son reclutadas a ambos extremos de la rotura donde DNA-PK estabiliza los extremos del DNA previniendo su resección. Mediante fosforilación de diversas proteínas, DNA-PK facilita el reclutamiento de factores de reparación como Artemis, que procesa los extremos libres del DNA favoreciendo la religación de estos extremos por la acción del complejo XRCC4/DNA ligasa 4 junto al factor XLF (Figura I-10) (Lieber et al., 2010).

Sin embargo, puesto que los extremos de las DSBs frecuentemente no son compatibles, la adecuada reparación de estas lesiones por la vía NHEJ requiere el procesamiento de los extremos de forma previa a la religación, lo que conduce a la pérdida de nucleótidos a ambos lados de la rotura. Por tanto, esta vía de reparación es propensa a errores y frecuentemente conlleva la pérdida de información genética (Mahaney et al., 2009).

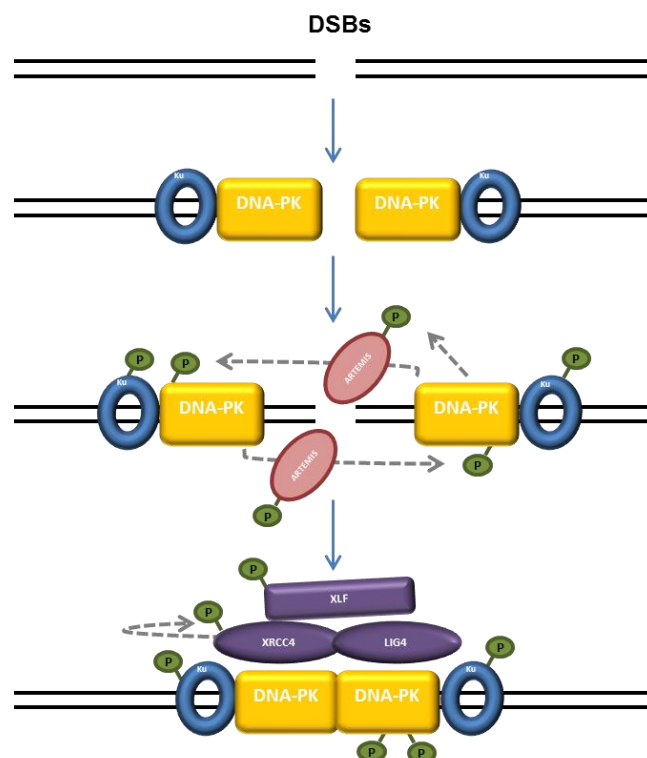


Figura I-10. Reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ). Los heterodímeros Ku70/Ku80 (en azul) y la quinasa DNA-PK (en amarillo) son reclutadas a ambos extremos de la rotura, previniendo su resección. Entre los factores reclutados se encuentra la proteína Artemis (en rosa) que procesa los extremos libres. Estos extremos son religados por acción del complejo XRCC4/DNA ligasa 4 (en morado). Adaptado de Ciccia and Elledge, 2010.

II. REPARACIÓN POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

La reparación por recombinación homóloga (*HR, Homologous Recombination*) es un proceso muy complejo en el que participan múltiples proteínas y que se lleva a cabo en las fases S y G2 del ciclo celular (Curtin, 2012). Este mecanismo de reparación es específico de estas fases del ciclo debido a que es necesaria la presencia de las dos cromátidas hermanas, utilizándose como molde una de ellas, y por estar regulado por fosforilación de varias proteínas por los complejos CDK (Krejci et al., 2012). Aunque esta vía es la responsable de reparar solo una pequeña proporción de las DSBs que se generan en la célula, su función resulta crucial para el mantenimiento de la estabilidad genómica ya que mutaciones en varias de las proteínas participantes en esta vía han sido implicadas en una gran variedad de cánceres (Jazaeri et al., 2002; Kim et al., 2001; Marsit et al., 2004; Mohindra et al., 2002).

1. Mecanismo de reparación por HR

La recombinación homóloga se inicia con el procesamiento del extremo 5' de las DSBs para generar DNA de cadena sencilla en el extremo 3'. Esta resección es iniciada por el complejo MRN junto con la endonucleasa CtIP, seguido posteriormente por la exonucleasa Exo1 (Cejka et al., 2010). Una vez que los extremos del DNA son procesados, las cadenas sencillas de DNA resultantes son recubiertas por el complejo proteico RPA, que actúa eliminando estructuras secundarias en el ssDNA y favoreciendo la posterior unión de polímeros de **RAD51** (*RADiation sensitive 51*) al DNA y la consecuente formación de los nucleofilamentos. RAD51 es una proteína intercambiadora de cadenas de DNA, que juega un papel central en las tres fases de la HR denominadas presinapsis, sinapsis y postsinapsis (Krejci et al., 2012).

En la fase presináptica, los polímeros de RAD51 son cargados en las cadenas de DNA sencillo constituyendo los denominados nucleofilamentos. Existen diferentes proteínas mediadoras que actúan facilitando la carga de RAD51 sobre el ssDNA, incrementando la estabilidad de los nucleofilamentos y protegiendo a RAD51 de ser eliminada del DNA por factores como helicasas (Figura I-11) (Krejci et al., 2012).

Una de las principales proteínas mediadoras es **BRCA2** (*BR*east *C*ancer *A*ssociated 2), la cual es capaz de interactuar con RAD51 a través de dos tipos de motivos como son los motivos BRC y la región TR2 en su región C-terminal. La unión de monómeros de RAD51 a los motivos BRC es importante para el secuestro de RAD51 en ciertos momentos del ciclo celular, especialmente cuando no hay DSBs para ser reparadas. La interacción entre la región TR2 con RAD51 es física y funcionalmente diferente a la mediada por los motivos BRC, siendo capaz de interactuar específicamente con polímeros de RAD51 pero no pudiendo unir monómeros de RAD51 (Esashi et al., 2007). Esta región presenta un residuo (Ser³²⁹¹) que es fosforilado por CDKs en fase G2 tardía del ciclo celular impidiendo su unión a los polímeros de RAD51 (Esashi et al., 2005; Esashi et al., 2007). Tras daño en el DNA, el complejo formado por BRCA2 y los

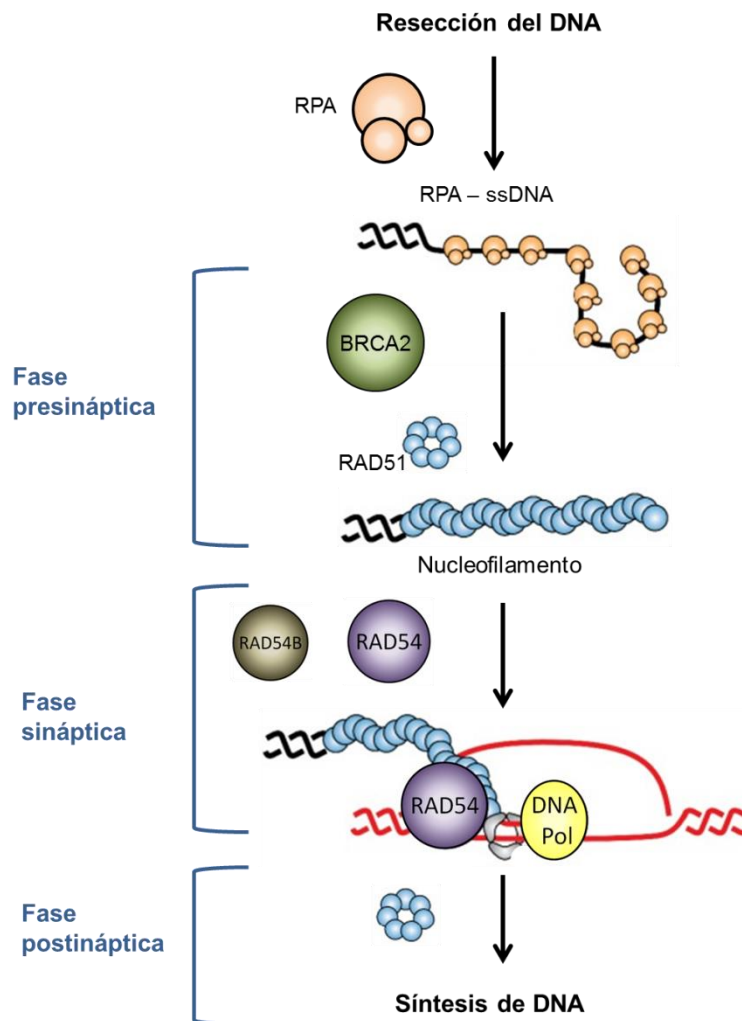


Figura I-11. Fases de la recombinación homóloga. Una vez que se produce la resección de los extremos por acción de las endonucleasas, las cadenas de ssDNA generadas son recubiertas por el complejo RPA. Este complejo posteriormente es sustituido por polímeros de RAD51 que son cargados en las cadenas de DNA sencillo constituyendo los denominados nucleofilamentos (Fase presináptica). En este proceso de carga y estabilización de los nucleofilamentos participan varias proteínas, siendo una de las principales BRCA2. Posteriormente, RAD51 facilita la migración de la cadena de DNA invasora hacia el dúplex de DNA homólogo que va a actuar como molde y la formación de una conexión física entre ambos, generándose un heterodúplex de DNA (*D-loop*) (Fase sináptica). En este punto, RAD54 y RAD54B actúan estabilizando los nucleofilamentos y estimulando la invasión mediada por esta recombinasa. Finalmente, los polímeros de RAD51 se disocian del DNA con el fin de que quede expuesto el extremo 3' invasor y sea utilizado como cebador para iniciar la síntesis de DNA utilizando como molde la cadena complementaria en la cromátida hermana (Fase postsináptica). Adaptado de Krejci et al., 2012.

monómeros de RAD51 se relocaliza en los sitios de lesión uniéndose directamente a la zona a través de su dominio de unión al DNA. Se produce entonces un cambio en la organización estructural y topológica de los monómeros de RAD51 unidos a los motivos BRC, que favorece la polimerización de estos monómeros de RAD51. El residuo Ser³²⁹¹ es desfosforilado por una fosfatasa desconocida hasta el momento, permitiéndose así la interacción de los polímeros de RAD51 con la región TR2 de BRCA2 y favoreciendo su carga en el DNA para formar los nucleofilamentos (Figura I-12) (Yata and Esashi, 2009).

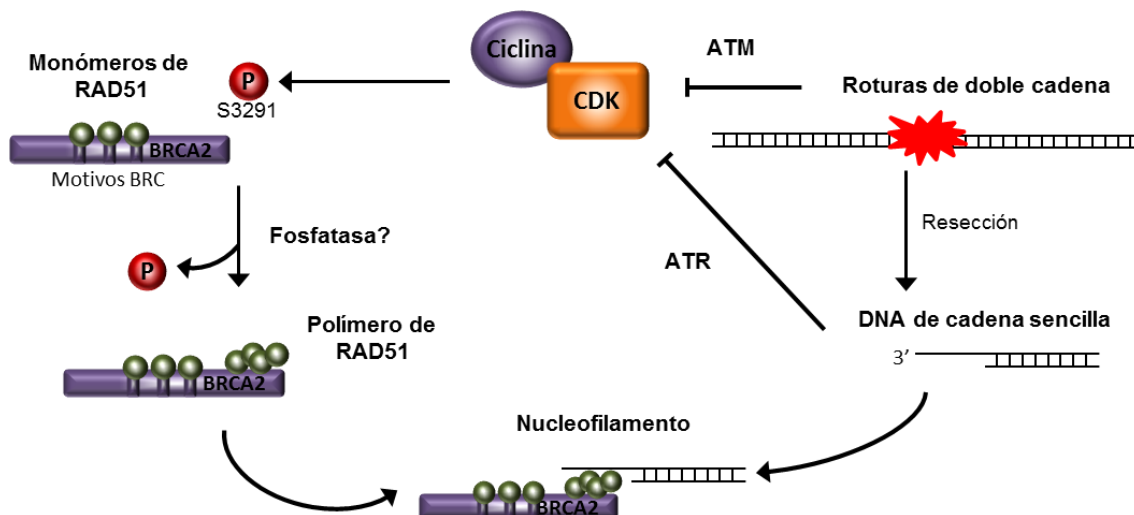


Figura I-12. Regulación de los complejos BRCA2-RAD51. BRCA2 interacciona con los monómeros de RAD51 a través de los motivos BRC secuestrándolos e impidiendo su polimerización en ciertas fases del ciclo. Tras daño en el DNA, el complejo BRCA2-RAD51 es reclutado hacia las zonas de lesión, favoreciéndose la nucleación de los monómeros para formar polímeros. Igualmente, la actividad CDK se ve reducida, por activación del *checkpoint*, y se elimina la fosforilación en el residuo Ser³²⁹¹ del dominio C-terminal de BRCA2, siendo capaz de interactuar con los polímeros de RAD51, cargándolos sobre el ssDNA y favoreciendo la formación de nucleofilamentos. Modificado de Yata and Esashi, 2009.

Otras proteínas que funcionan como mediadoras, promoviendo y/o estabilizando los nucleofilamentos son **RAD51B**, **RAD51C**, **RAD51D**, **XRCC2** y **XRCC3**. El complejo RAD51B-RAD51C-RAD51D-XRCC2 presenta alta afinidad por sustratos unidos a DNA y participa en la formación y estabilización de los nucleofilamentos durante la reparación de horquillas de replicación dañadas (Petermann et al., 2010). El complejo RAD51C-XRCC3 juega un papel en los pasos finales del proceso de recombinación homóloga (Liu et al., 2007).

Durante la fase sináptica, RAD51 facilita la migración de la cadena de DNA invasora hacia el dúplex de DNA homólogo que va a actuar como molde y la formación de una conexión física entre ambos generándose un heterodúplex de DNA (*D-loop*). **RAD54** y **RAD54B** actúan como reguladores positivos de RAD51, estabilizando los filamentos presinápticos y estimulando la invasión mediada por esta recombinasa. Sin embargo, ambos actúan como reguladores negativos de RAD51 en fases posteriores, eliminando los filamentos de RAD51 del DNA (Figura I-11) (Ceballos and Heyer, 2011).

Finalmente, durante la fase postsináptica los polímeros de RAD51 se disocian del DNA con el fin de que quede expuesto el extremo 3' invasor y sea utilizado como cebador para iniciar la síntesis de DNA utilizando como molde la cadena complementaria en la cromátida hermana (Figura I-11) (Krejci et al., 2012).

Una vez que la síntesis de DNA comienza, el proceso de HR puede finalizar de tres formas diferentes:

- Modelo DSBR (*Double-Strand Break Repair*): el otro extremo de la DSB participa uniéndose a la región de DNA recién sintetizado, estabilizando la estructura *D-loop* llevando a la generación de una doble unión de Holliday (*dHJ*, *double-Holliday Junction*), que puede resolverse generando cromátidas en las que ha habido intercambio de secuencias o cromátidas sin intercambio. Este mecanismo con intercambio de secuencias de las cromátidas suele ocurrir durante meiosis (Figura I-13) (Krogh and Symington, 2004).
- Modelo SDSA (*Synthesis-Dependent Strand-Annealing*): la cadena invasora es desplazada de la región de *D-loop* anillando con su hebra complementaria y completando la síntesis de DNA utilizando como molde su propia hebra complementaria. Durante mitosis, las células suelen utilizar más este mecanismo que el de DSBR (Figura I-13) (Allers and Lichten, 2001).
- Modelo BIR (*Break-Induced Replication*): la estructura en *D-loop* pasa a actuar como una horquilla de replicación, sintetizándose de nuevo la cromátida a partir de un único extremo. Este mecanismo ocurre cuando solo hay un extremo del DNA debido a la pérdida del otro extremo (Figura I-13) (Malkova et al., 1996).

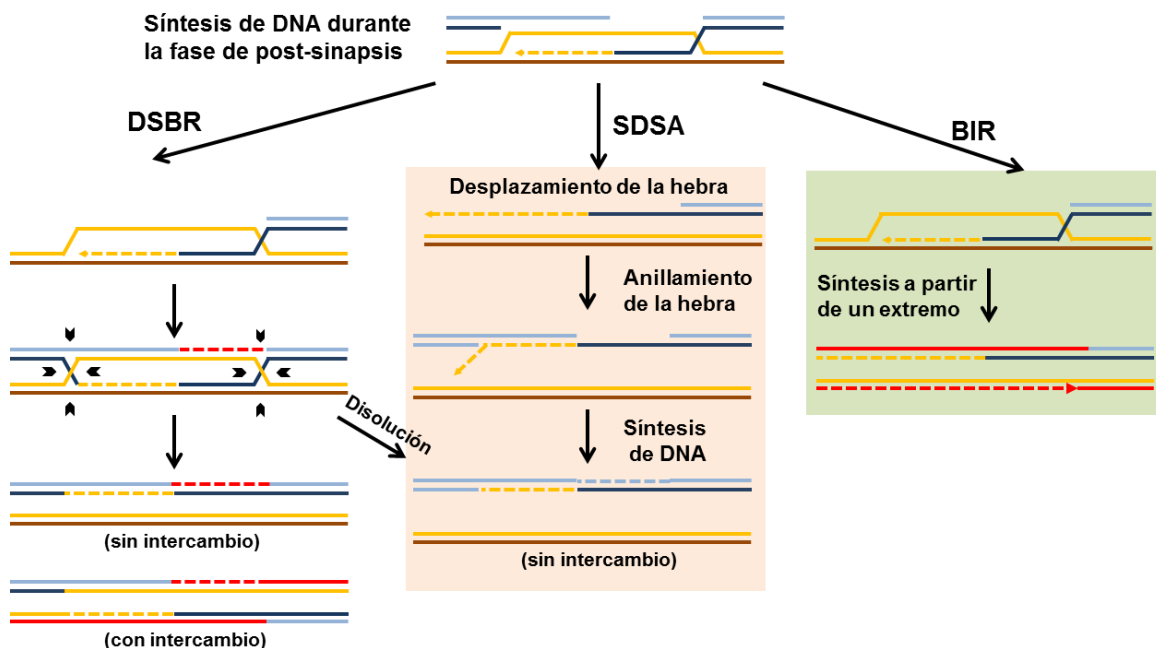


Figura I-13. Modelos de finalización de la HR. Una vez que la síntesis de DNA comienza, el proceso de HR puede finalizar produciéndose la unión del otro extremo al DNA recién sintetizado, formándose la denominada Unión de Holliday que puede resolverse sin intercambio o con intercambio de secuencias entre las cromátidas hermanas (Modelo DSBR), desplazándose la cadena invasora de la región del *D-loop* y completando la síntesis de DNA utilizando como molde su propia hebra complementaria (Modelo SDSA) o actuando la estructura en *D-loop* como una horquilla de replicación, sintetizándose de nuevo la cromátida a partir de un único extremo (Modelo BIR).

2. Regulación de las proteínas participantes en la HR por fosforilación por CDK

Una vez que se han generado las roturas de doble cadena, la célula debe elegir el mecanismo adecuado para su reparación, NHEJ o HR, elección que viene determinada por los niveles de actividad CDK, es decir, por la fase del ciclo en la que se ha producido el daño. Además, esta actividad CDK debe ser regulada de forma apropiada ya que bajos niveles de actividad sensibilizan a las células frente a daño en el DNA, pero niveles demasiados elevados conducen también a inestabilidad genómica (Enserink et al., 2009).

El proceso de HR es iniciado con el procesamiento de los extremos de la rotura del DNA por nucleasas que generan cadenas de DNA sencillas. Se ha comprobado que la actividad CDK es necesaria para promover la actividad de la maquinaria de resección tanto en levaduras como en vertebrados (Ira et al., 2004; Jazayeri et al., 2006). Los complejos CDK fosforilan a la endonucleasa CtIP lo que lleva a su activación (Huertas and Jackson, 2009) y también favorecen la formación de un complejo con MRN y BRCA1, interacción que es necesaria para el reclutamiento de CtIP a las zonas de lesión (Chen et al., 2011b). El proceso de resección también está mediado por fosforilaciones por CDKs sobre proteínas adicionales, como es la fosforilación de NBS1, componente del complejo MRN, necesaria para promover la actividad nucleasa de Mre11 con la consiguiente formación de ssDNA (Falck et al., 2012).

La actividad CDK también actúa regulando otros pasos posteriores en el proceso de recombinación homóloga. De este modo y como ya se ha mencionado, la fosforilación en el residuo Ser³²⁹¹ de BRCA2 por los complejos CDK en la transición G2/M impide el reclutamiento y depósito de los polímeros de RAD51 sobre el ssDNA, constituyendo un mecanismo que inhibe el proceso de recombinación homóloga cuando se va a producir la segregación de los cromosomas. Tras daño en el DNA, esta fosforilación es revertida, para permitir la eficiente actuación del sistema de reparación (Esashi et al., 2005; Yata and Esashi, 2009).

FUNCIÓN DE LAS FOSFATASAS EN LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL DNA

Como ya hemos mencionado, la respuesta a daño en el DNA implica la activación del *checkpoint* de daño y la activación de mecanismos de reparación del daño generado. La visión tradicional que se tenía acerca de esta ruta de respuesta consistía en que tras daño en el DNA se desencadena una cascada de fosforilaciones, mediadas por diferentes quinasas que era la responsable principal de la activación del *checkpoint* y del proceso de reparación. Una vez reparado el daño, estas fosforilaciones eran revertidas por las correspondientes fosfatasas, permitiendo la recuperación de las células y su reentrada en el ciclo celular. Trabajos de los últimos años han demostrado que fosfatasas como PP1, PP2A, PP4, PP5, PP6 y Wip1,

además de participar en la inactivación de la DDR, están implicadas en la activación de la respuesta a daño y también en mantener a diversas proteínas que participan en la DDR en un estado inactivo durante el crecimiento normal de las células (Freeman and Monteiro, 2010; Lee and Chowdhury, 2011; Shimada and Nakanishi, 2013).

Para la activación tanto del *checkpoint* de daño al DNA como de la reparación son necesarias tanto la fosforilación de proteínas como la desfosforilación de varias de ellas. Así, algunas proteínas son desfosforiladas a los pocos minutos tras daño en el DNA. Un ejemplo es el caso de la proteína adaptadora MDC1, que se encuentra constitutivamente fosforilada y debe ser desfosforilada para su reclutamiento en los focos de daño y para su interacción con otras proteínas de la DDR (Bennetzen et al., 2010) (Figura I-14,I). Además, diferentes proteínas participantes en la DDR presentan múltiples sitios fosforilables y sufren ciclos de fosforilación/desfosforilación durante las primeras horas tras daño en el DNA, controlados por una combinación de quinasas y fosfatasa que actúan en *tándem*. Es posible que esas variaciones en el estado de fosforilación regulen su reclutamiento y liberación secuencial de los sitios de daño (Figura I-14,II). Existen también diversas proteínas cuya fosforilación se produce relativamente tarde en la DDR. Puesto que las quinasas están activas desde pocos minutos después de la generación del daño en el DNA, se especula que las fosfatasas actúan manteniendo desfosforiladas estas proteínas desde fases tempranas de la DDR. Un ejemplo es la proteína RPA. La fosfatasa PP4 desfosforila la subunidad RPA2 del complejo heterotrimérico RPA, manteniéndola hipofosforilada tras daño en el DNA. RPA2 hiperfosforilada impide la unión del complejo RPA al DNA, retiene a RAD51 en la fracción nuclear soluble, previniendo su reclutamiento hacia el DNA y se une a factores de reparación, impidiendo la formación de los focos de daño. Por tanto, resulta esencial su regulación ya que su prematura fosforilación impide la reparación por recombinación homóloga y aumenta la sensibilidad frente a agentes de daño (Lee et al., 2010) (Figura I-14,III). Por último, muchas de las proteínas que participan en la DDR son fosforiladas inmediatamente tras daño en el DNA y esta fosforilación persiste durante varias horas. Una vez que se ha producido la reparación del daño, deben ser desfosforiladas para permitir la inactivación de la DDR. Un ejemplo es la desfosforilación del residuo Ser¹³⁹ de H2AX, llevada a cabo por diversas fosfatasas entre las que se incluyen PP1, PP2A, PP4, PP6 y Wip1. No se conoce la contribución exacta de cada una de ellas, pero parece existir un cierto nivel de redundancia entre ellas, al mismo tiempo que una cierta especificidad en función de la localización de γ H2AX y del tipo de daño (Chowdhury et al., 2005; Chowdhury et al., 2008; Douglas et al., 2010b; Macurek et al., 2010) (Figura I-14,IV).

Por tanto, la activación tanto del *checkpoint* de daño al DNA como de la reparación son procesos complejos que implican ciclos dinámicos de fosforilación y desfosforilación de las diferentes proteínas participantes (Freeman and Monteiro, 2010; Lee and Chowdhury, 2011; Shimada and Nakanishi, 2013). La regulación espacial y temporal de estos procesos es esencial para la correcta funcionalidad de la DDR y está determinada por un complejo balance de actividades quinasa y fosfatasa. Aunque el papel de las quinasas en la DDR está bastante bien caracterizado, el papel de las fosfatasas es poco conocido, debido en parte a la dificultad

de trabajar con estas proteínas ya que muchas de ellas forman complejos con muy diversas subunidades reguladoras que determinan su especificidad de sustrato, localización subcelular o actividad, y además es frecuente que varias de estas fosfatasa actúen sobre un mismo sustrato.

Las fosfatasa participantes en la DDR pueden ser utilizadas como dianas antitumorales. Se ha observado que ratones *knockout* para Wip1 son resistentes al desarrollo de tumores, tanto generados de forma espontánea como tras someterlos a agentes oncogénicos (Bulavin et al., 2004; Saito-Ohara et al., 2003). Por otro lado, la inhibición de PP1 o PP2A también tiene ciertos efectos reduciendo la resistencia de los tumores frente a radiación y quimioterapia (Hamilton et al., 2009; Lu et al., 2009). Aunque es difícil utilizar inhibidores de estas fosfatasa como terapia contra el cáncer porque muchas de ellas están implicadas en una amplia variedad de procesos celulares, sí que resulta de especial importancia impedir su interacción con los sustratos de interés inhibiendo la actividad de las subunidades reguladoras responsables de determinar esa especificidad de sustrato. Por todo ello, resulta de especial interés conocer la función y regulación de las fosfatasa implicadas en la DDR.

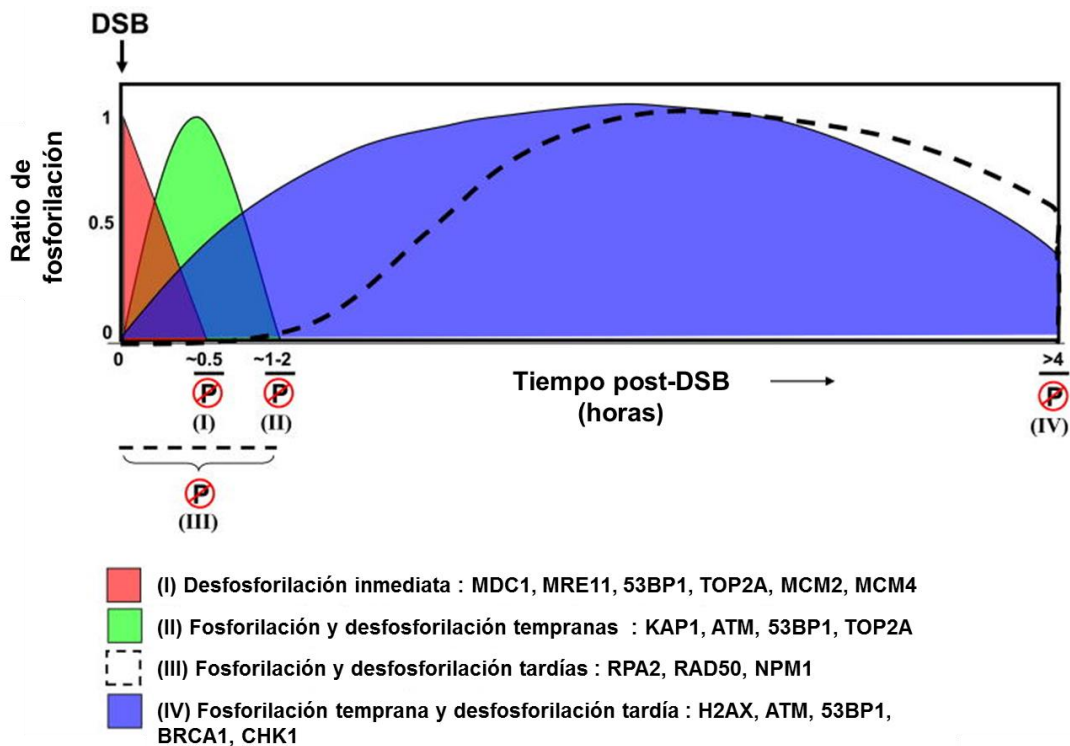


Figura I-14. Función de las fosfatasa en la DDR. Las fosfatasa presentan un papel activo a lo largo de la respuesta a daño en el DNA. Algunas proteínas de la DDR están fosforilados desde etapas tempranas y deben ser desfosforilados rápidamente (I). Diferentes proteínas sufren ciclos de fosforilación/desfosforilación en las primeras horas tras daño (II). Algunos de las proteínas sufren fosforilación varias horas después de iniciarse la respuesta a daño siendo las fosfatasa las responsables de mantener su estado desfosforilado (III). Aquellas proteínas que han sido fosforiladas al inicio de la respuesta y cuyo estado de fosforilación persiste durante varias horas deben ser finalmente desfosforiladas para permitir la inactivación de la DDR (IV). Modificado de Lee and Chowdhury, 2011.

OBJETIVOS

1. Estudiar la función de hCdc14A a la salida de mitosis así como su posible implicación en la segregación cromosómica.
2. Estudiar la función de hCdc14B en la Respuesta a Daño en el DNA.

RESULTADOS

I. hCdc14A COMO POSIBLE FOSFATASA IMPLICADA EN LA SALIDA DE MITOSIS

En la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc14 es una proteína esencial a la salida de mitosis. Está implicada en numerosos procesos de esta fase del ciclo, mediante la eliminación de fosforilaciones de CDK en diversos sustratos. Así, Cdc14 es necesaria en este organismo para iniciar la segregación cromosómica, para la estabilidad del huso mitótico en anafase, la correcta segregación del rDNA y regiones teloméricas, la inhibición de la transcripción en esta fase del ciclo, la inactivación de los complejos CDK a la salida de mitosis y, finalmente, para la citoquinesis (Clemente-Blanco et al., 2009; Clemente-Blanco et al., 2011; Khmelinskii et al., 2007; Kuilman et al., 2014; Pereira and Schiebel, 2003; Queralt and Uhlmann, 2008).

En *Schizosaccharomyces pombe*, su ortólogo Flp1 no es un gen esencial, pero sí tiene una función importante a la salida de mitosis inhibiendo la actividad Cdk y coordinando la división nuclear y la citoquinesis (Cueille et al., 2001; Esteban et al., 2004; Trautmann et al., 2001). Además, Flp1 está implicado, junto con la quinasa Aurora B, en la correcta orientación de las cromátidas hermanas y, consecuentemente, en su segregación (Trautmann et al., 2004).

Al inicio de este trabajo, se conocía muy poco acerca de las funciones de las dos isoformas principales en células humanas, hCdc14A y hCdc14B. Nuestro grupo puso de manifiesto que ambas isoformas eran capaces de rescatar los fenotipos originados por la falta de Flp1 en *S. pombe*, indicando que existe cierta homología funcional entre ellos (Vazquez-Novelle et al., 2005). Se había relacionado a hCdc14A con el ciclo de replicación del centrosoma y, como consecuencia de ello, con la segregación cromosómica y la citoquinesis (Kaiser et al., 2002; Mailand et al., 2002a). También en nuestro grupo, comprobamos que hCdc14A tenía un papel a la entrada en mitosis al inhibir la actividad CDK mitótica mediante la regulación de hCdc25A y hCdc25B, así como de la quinasa Wee1 (Ovejero et al., 2012; Vazquez-Novelle et al., 2010). Por su parte, hCdc14B había sido implicada en el control de la arquitectura nuclear (Nalepa and Harper, 2004), la regulación de la dinámica del huso mitótico y del ciclo de división del centrosoma (Cho et al., 2005; Wu et al., 2008), la regulación de la transición M/G1 (Rodier et al., 2008) y la activación de la respuesta a daño en el DNA (Bassermann et al., 2008).

En base a los datos obtenidos sobre la función de hCdc14A en el control de la actividad CDK a la entrada en mitosis, y dado nuestro interés en identificar las fosfatasa responsables de la regulación de la salida de mitosis, revirtiendo las fosforilaciones mediadas por los complejos CDK mitóticos, nos planteamos la posibilidad de que hCdc14A fuera una de ellas. En nuestras condiciones experimentales, la desregulación de hCdc14B no parecía causar alteraciones significativas en la progresión por el ciclo celular, por lo que descartamos trabajar con esta isoforma para este objetivo.

1. Análisis de la cinética de salida de mitosis en células carentes de hCdc14A

Datos previos de nuestro grupo, obtenidos en experimentos con sobreexpresión de hCdc14A a la salida de mitosis, mostraron que en estas condiciones se producía una inactivación más rápida de la actividad CDK mitótica a la salida de mitosis. De igual modo, la sobreexpresión de esta fosfatasa producía una desfosforilación y degradación de hCdc25A más rápida respecto a células control en este punto del ciclo. Estos datos parecían indicar que hCdc14A podría participar en la inhibición de los complejos CDK1-Ciclina B1 a la salida de mitosis, mediante regulación de hCdc25A y quizás también de otros de sus reguladores como hCdc25B y Wee1, todos ellos sustratos de hCdc14A a la entrada en mitosis. Con el fin de analizar esta posible función de hCdc14A, nos planteamos caracterizar la cinética de salida de mitosis en células carentes de la fosfatasa.

En primer lugar, analizamos la cinética de salida de mitosis en células deplecionadas para hCdc14A mediante el uso de RNAs de interferencia (siRNAs) específicos, previamente validados (Vazquez-Novelle et al., 2010). En la Figura 1A se muestra un esquema de la estrategia experimental realizada. Sincronizamos células U2OS en G1/S mediante un tratamiento con timidina. Estas células fueron liberadas del bloqueo y transfectadas con siRNAs frente a hCdc14A o siRNAs control. La sincronización permite que la depleción de la proteína se produzca en el mismo punto del ciclo para todas las células. Tras 12 horas de transfección, las células fueron tratadas de nuevo con timidina durante 24 horas para conseguir su bloqueo en G1/S y, finalmente, fueron liberadas en presencia de nocodazol, lo que permite su progresión por G2 y su final arresto en prometáfase, debido a que el nocodazol impide la polimerización de los microtúbulos y por tanto la formación del huso mitótico. Recogimos las células mitóticas por *shake off*, que consiste en seleccionar las células mitóticas (redondeadas y no adheridas a la placa) mediante suaves golpes y su posterior recogida con el medio de cultivo. Estas células fueron lavadas dos veces con PBS para eliminar el nocodazol y plaqueadas en medio fresco, permitiendo así la polimerización de los microtúbulos y formación de husos mitóticos funcionales, que permiten que las células progresen por las etapas finales de la mitosis y comienzo de G1. Analizamos la salida de mitosis mediante marcadores bioquímicos clásicos como desfosforilación de los reguladores de los complejos de CDK, hCdc25A y Wee1, desfosforilación de la histona H3 así como degradación de ciclina B1. En paralelo, comprobamos la progresión por estas últimas fases de la mitosis y comienzo de G1 mediante el análisis del contenido en DNA por citometría de flujo (Figura 1C). Como se observa en la Figura 1D, la falta de hCdc14A no impidió o retrasó la cinética de salida de mitosis, indicando que la fosfatasa no parece ser esencial en este punto del ciclo. Además, en base a estos resultados, no parece que hCdc14A sea la responsable de desfosforilar a hCdc25A y Wee1 para inducir su degradación y estabilización, respectivamente, en esta fase del ciclo.

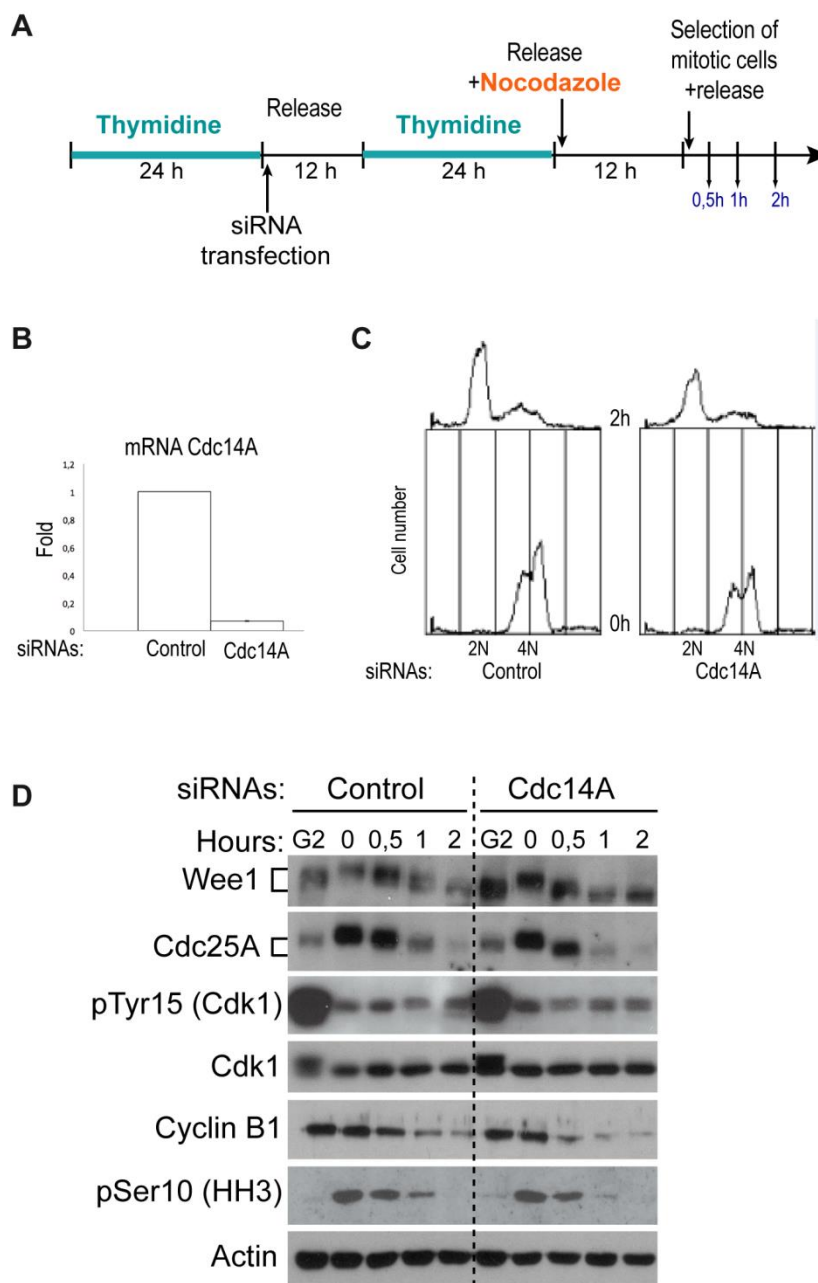


Figura 1. hCdc14A no es esencial para la salida de mitosis. A) Se sincronizaron células U2OS mediante un doble bloqueo con timidina. Entre ambos bloqueos, se transfectaron las células con siRNAs frente a hCdc14A o siRNAs control. Tras la liberación del segundo bloqueo, se añadió nocodazol al medio para permitir la acumulación de las células al inicio de mitosis. Se recogieron las células mitóticas por *shake off* y se liberaron en medio fresco para permitir su salida de mitosis. **B)** La eficiencia de depleción se determinó analizando los niveles de mRNA de hCdc14A mediante RT-qPCR. Se consideró valor 1 a la cantidad de mRNA de hCdc14A presente en las muestras control y se refirió a ella la cantidad de mRNA presente en las células tratadas con siRNAs para hCdc14A. **C, D)** Se recogieron muestras a los tiempos indicados para su posterior análisis mediante citometría de flujo y *western blot* con los anticuerpos indicados.

Sin embargo, dado que es difícil detectar la proteína hCdc14A endógena con los anticuerpos disponibles, no podemos descartar que a pesar de que sus niveles de mRNA tras el tratamiento con los siRNAs son muy bajos (Figura 1B), existan niveles de proteína suficientes para llevar a cabo su acción. Para descartar esta posibilidad utilizamos células

hTERT-RPE (*human Telomerase Reverse Transcriptase-immortalized Retinal Pigment Epithelial*) *knockout* (KO) para hCdc14A (hCdc14A^{-/-}) y células hCdc14A^{-flox} que solo presentan un alelo funcional, descritas en el artículo Mocciaro et al., 2010 y cedidas por el grupo del Dr. Jallepalli (*Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NY*). Como células control utilizamos células RPE wt. Sincronizamos las células en prometafase mediante tratamiento con nocodazol y las células mitóticas fueron recogidas y liberadas en medio de cultivo sin droga para permitir la progresión por mitosis y comienzo de G1 (Figura 2A). En base a la cinética de desfosforilación de Wee1 y degradación de ciclina B1 (Figura 2D), corroboramos que la falta de hCdc14A no impide ni retrasa la cinética de salida de mitosis.

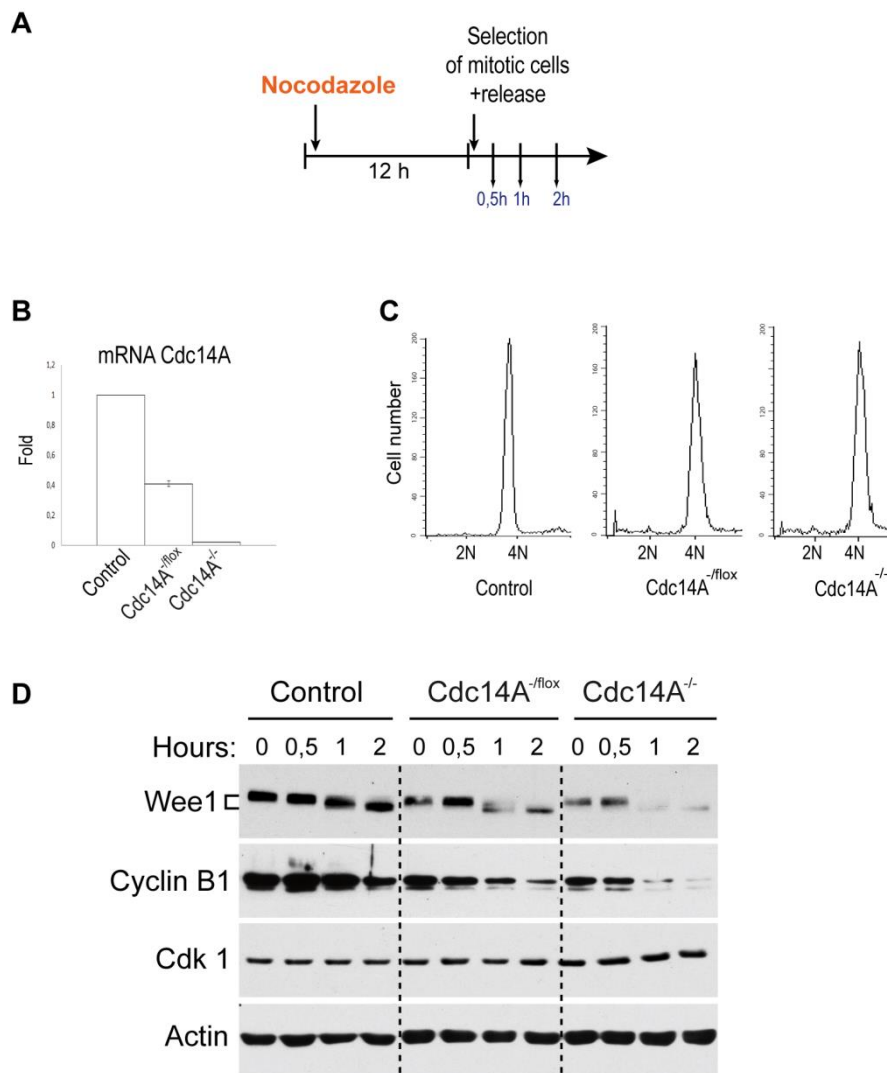


Figura 2. La falta de hCdc14A no retrasa la salida de mitosis. **A)** Células RPE control, RPE hCdc14A^{-flox} y RPE hCdc14A^{-/-} fueron bloqueadas en prometafase mediante tratamiento con nocodazol. Se recogieron las células mitóticas por *shake off* y se liberaron en medio fresco para permitir su salida de mitosis. **B)** Se consideró valor 1 a la cantidad de mRNA de hCdc14A presente en las células control y se refirió a ella la cantidad de mRNA presente en las células hCdc14A^{-flox} y hCdc14A^{-/-}. **C, D)** Se recogieron muestras a los tiempos indicados para su posterior análisis mediante citometría de flujo y *western blot* con los anticuerpos indicados.

Considerando además la posibilidad de que las células KO constitutivas para hCdc14A hayan sufrido un proceso de adaptación y que la falta de esta fosfatasa haya sido complementada por otra fosfatasa, utilizamos también células RPE KO condicionales (hCdc14A^{-flox}) que nos permiten realizar la delección génica en un momento concreto y previo a nuestro análisis. Estas células presentan un alelo de hCdc14A delecionado mientras que el otro presenta el exón 2 flanqueado por sitios *loxP*, de modo que mediante infección con adenovirus portadores de la Cre recombinasa se produjo la excisión del exón. Como control utilizamos células RPE wt y las propias hCdc14A^{-flox} (Figura 3A y B). De nuevo, corroboramos los resultados anteriores (Figura 3D).

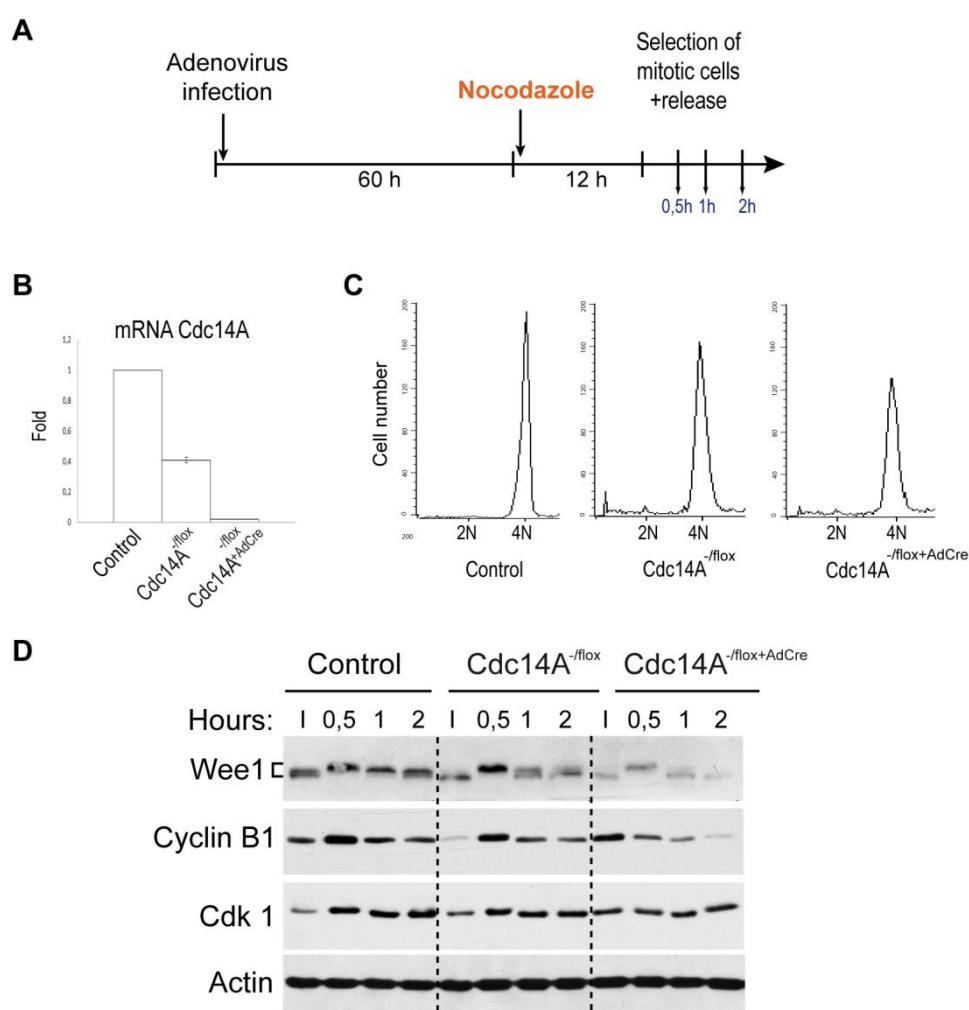


Figura 3. hCdc14A es dispensable para la salida de mitosis. A) Células RPE hCdc14A^{-flox} se infectaron con adenovirus portadores de la Cre recombinasa. Estas células junto con células RPE hCdc14A^{-flox} y células control fueron bloqueadas en prometafase mediante tratamiento con nocodazol. Se recogieron las células mitóticas por *shake off* y se liberaron en medio fresco para permitir su salida de mitosis. **B)** La eficiencia de delección se determinó analizando los niveles de mRNA de hCdc14A mediante RT-qPCR. Se consideró valor 1 a la cantidad de mRNA de hCdc14A presente en las muestras control y se refirió a ella la cantidad de mRNA presente en las células hCdc14A^{-flox} y hCdc14A^{-flox} infectadas con adenovirus portadores de la Cre recombinasa. **C, D)** Se recogieron muestras a los tiempos indicados para su posterior análisis mediante citometría de flujo y *western blot* con los anticuerpos indicados.

Todos estos resultados muestran que la carencia de hCdc14A no impide ni retrasa la cinética de salida de mitosis, indicando que esta fosfatasa no parece ser esencial en este punto del ciclo. Sin embargo, cabe destacar que en estos experimentos se observa que la falta de hCdc14A produce una cinética de salida de mitosis ligeramente acelerada con respecto a células control, reflejada en una desfosforilación más rápida de Wee1, de hCdc25A y de la histona H3, y también en una degradación más rápida de ciclina B1. Estos resultados sugieren una posible participación de hCdc14A en el *checkpoint* del ensamblaje del huso mitótico (SAC). Desde que las células entran en mitosis se produce la activación del SAC, siendo la señal que activa este punto de control la presencia de cinetocoros no unidos a microtúbulos del huso mitótico o unidos de forma anómala (uniones no bipolares). De este modo, el SAC bloquea el inicio de anafase hasta conseguir la correcta orientación bipolar de los cromosomas en la placa metafásica, previa a la segregación. En nuestros experimentos, las células están bloqueadas en prometáfase ante la presencia de nocodazol con la consiguiente activación de este punto de control. Tras la liberación de nocodazol, se permite la polimerización de los microtúbulos, la formación del huso mitótico y la unión de los cinetocoros a los microtúbulos. Finalmente, una vez que todas las uniones son correctas, el SAC se inactiva y se inicia la segregación cromosómica. Es posible que hCdc14A participe en este punto de control, de modo que ante la falta de la misma, el SAC no funcione correctamente. Ello explicaría la progresión por las etapas finales de la mitosis más rápida que en las células control y podría dar lugar a que la segregación cromosómica se produjese antes de que todos los cinetocoros estuviesen correctamente unidos a los microtúbulos dando lugar a anomalías en el proceso de segregación.

2. Análisis de la segregación cromosómica en células deficientes en hCdc14A

Con el fin de comprobar si las células carentes de hCdc14A presentan defectos en segregación, analizamos las células mitóticas mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo anti- α tubulina y tinción con DAPI para visualizar el huso mitótico y el DNA, respectivamente. Utilizamos células RPE KO hCdc14A condicionales y, como control, células RPE wt, hCdc14A^{-flox} y hCdc14A^{-flox} infectadas con adenovirus portadores de GFP (Figura 4A). Observamos que las células hCdc14A^{-flox}, las cuales carecen de un alelo de hCdc14A, y por lo tanto tienen la mitad del contenido de la fosfatasa (Figura 4B), muestran un porcentaje bajo, similar o incluso menor al de células RPE wt, de segregaciones anómalas (2% versus 5%). En la figura 4C se muestran el tipo de defectos observados en segregación, caracterizados por la incompleta separación de las cromátidas y también por la formación de husos mitóticos anómalos. Sin embargo, la delección del otro alelo en las células hCdc14A^{-flox} produjo anomalías en el proceso de segregación en el 21% de células analizadas frente a un 11% en las células infectadas con adenovirus portadores de GFP (células control). Estos análisis mostraron que, si bien el porcentaje de segregaciones anómalas detectadas en las células

deficientes en hCdc14A no es muy alto, sí es mayor al de células control. También analizamos la segregación cromosómica en células U2OS en las que se silenció la expresión de hCdc14A mediante siRNAs, obteniendo resultados comparables a los descritos anteriormente en células RPE deficientes en hCdc14A. Estos resultados sugieren que hCdc14A pueda estar implicada en el SAC y, como consecuencia de su carencia en las células, se muestren estos defectos en segregación, o que hCdc14A participe de forma independiente al SAC en el proceso de segregación cromosómica.

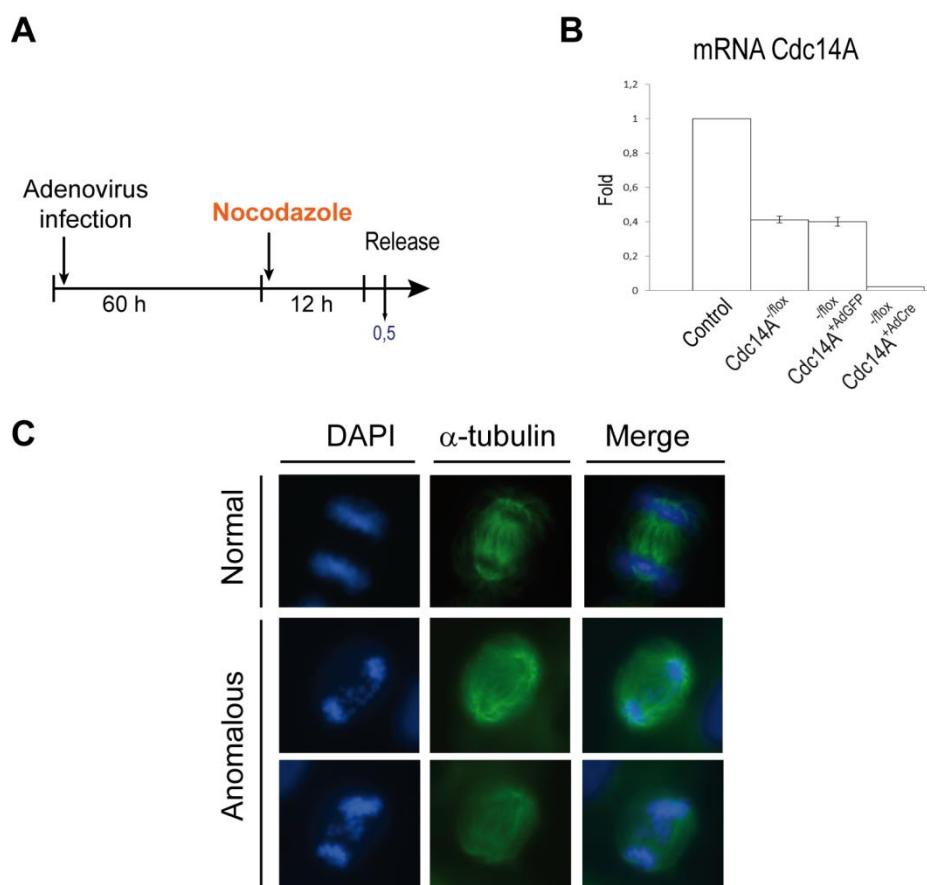


Figura 4. Células carentes de hCdc14A presentan anomalías en el proceso de segregación cromosómica. A) Células RPE hCdc14A^{-flox} se infectaron con adenovirus portadores de la Cre recombinasa o con adenovirus portadores de GFP. Estas células junto con células RPE hCdc14A^{-flox} y células RPE wt fueron bloqueadas en prometafase mediante tratamiento con nocodazol. Tras 12 horas de tratamiento, se liberaron del bloqueo para permitir su salida de mitosis y se fijaron con metanol tras 30 minutos de liberación. **B)** La eficiencia de delección se determinó analizando los niveles de mRNA de hCdc14A mediante RT-qPCR. Se consideró valor 1 a la cantidad de mRNA de hCdc14A presente en las muestras control y se refirió a ella la cantidad de mRNA presente en las células hCdc14A^{-flox} infectadas o no con adenovirus portadores de la Cre recombinasa o con adenovirus portadores de GFP. **C)** Se llevó a cabo inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo frente a α -tubulina y los núcleos se tiñeron con DAPI. Las imágenes se adquirieron con un objetivo 63x.

El complejo CPC, formado por Aurora B y tres subunidades no enzimáticas, INCENP, Survivin y Borealin, presenta una localización muy dinámica durante la mitosis detectándose inicialmente a lo largo de los brazos de los cromosomas y concentrándose de forma progresiva en los centrómeros durante prometafase y metafase (Monier et al., 2007). Posteriormente se transfiere hacia la zona media del huso en anafase y telofase y al cuerpo medio en citoquinesis. Este cambio de localización regula su función y, alteraciones en esta, se traducen en defectos en las uniones cinetocoro-microtúbulo, en la orientación bipolar de los cromosomas, en la segregación y en la citoquinesis (Carlton et al., 2012; Saurin et al., 2011; Vazquez-Novelle and Petronczki, 2010; Welburn et al., 2010). En *Schizosaccharomyces pombe*, Flp1 parece regular la correcta orientación bipolar de las cromátidas hermanas a través de la regulación, por un mecanismo aún desconocido, de Aurora B. La falta de Flp1 causa co-segregación de las cromátidas, observándose una reducción de los niveles de Aurora B en los cinetocoros (Trautmann et al., 2004). En *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc14 desfosforila al ortólogo de INCENP siendo esta desfosforilación necesaria para la transferencia del CPC hacia la zona media del huso en anafase (Pereira and Schiebel, 2003). Igualmente, en células humanas, el reclutamiento de este complejo hacia la zona central del huso ocurre en anafase, cuando se revierten las fosforilaciones inhibitoras mediadas por CDK1 sobre INCENP (Hummer and Mayer, 2009), siendo hCdc14A capaz de desfosforilarlo *in vitro* (Gruneberg et al., 2004). Basándonos en estos datos, nos planteamos analizar la localización del complejo CPC, en concreto de Aurora B, al inicio de anafase en células U2OS deplecionadas para hCdc14A. Del total de células en anafase analizadas, en un 14% Aurora B seguía asociada a los cromosomas, al menos en parte (Figura 5C). En el caso de las células control esta localización anómala solo se observó en un 2% de las anafases (Figura 5C). Este porcentaje es similar al de anomalías observadas en segregación indicando que esta desregulación en la localización de Aurora B, quizás mediada de forma directa por desfosforilación de INCENP por hCdc14A (Gruneberg et al., 2004), podría ser la causa de las anomalías en segregación cromosómica observadas en células deficientes en hCdc14A. Sin embargo, estos datos no pudimos confirmarlos con datos adicionales *in vivo*.

Estos resultados sugieren que hCdc14A podría participar en la segregación cromosómica a través de diferentes mecanismos moleculares. Por un lado, a través de una posible función en el mantenimiento del SAC, de modo que, ante la falta de hCdc14A no se daría tiempo suficiente para unir correctamente todos los cinetocoros a los microtúbulos del huso mitótico, llevando a segregaciones desiguales o incompletas. Por otro lado, también podría participar en este proceso regulando la localización de Aurora B, de modo que, alteraciones en la localización de esta quinasa afectasen a su función dando lugar a anomalías en segregación.

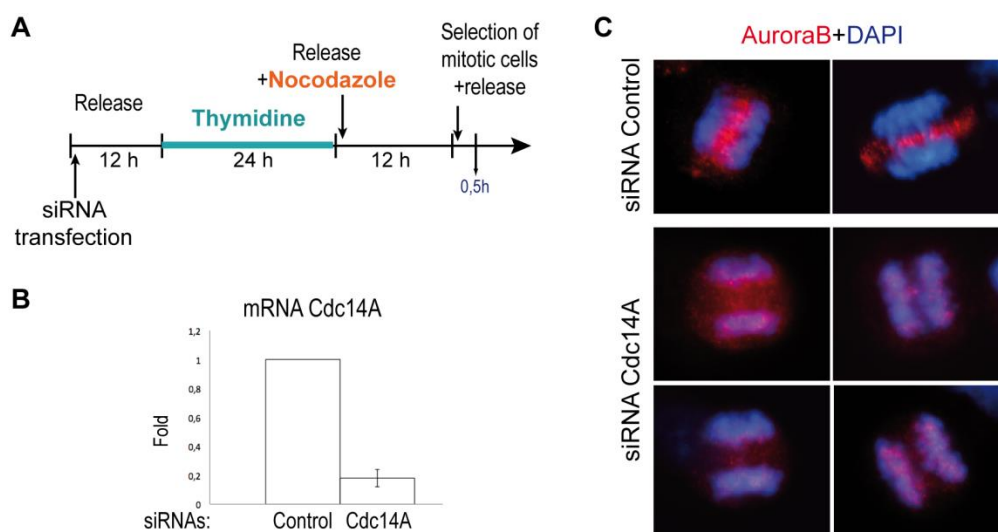


Figura 5. Células deficientes en hCdc14A presentan deslocalización de Aurora B en etapas finales de la mitosis. A) Células U2OS se transfectaron con siRNAs frente a hCdc14A o siRNAs control. Tras 12 horas de transfección, las células se bloquearon en G1/S mediante tratamiento con timidina. Tras la liberación del bloqueo, se añadió nocodazol al medio para permitir la acumulación de las células en prometáfase. Las células se liberaron del bloqueo para permitir su salida de mitosis y se fijaron con metanol tras 30 minutos de liberación. **B)** La eficiencia de depleción se determinó analizando los niveles de mRNA de hCdc14A mediante RT-qPCR. Se consideró valor 1 a la cantidad de mRNA de hCdc14A presente en las muestras control y se refirió a ella la cantidad de mRNA presente en las células tratadas con siRNAs para hCdc14A. **C)** Se llevó a cabo inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo frente a Aurora B y los núcleos se tiñeron con DAPI. Las imágenes se adquirieron con un objetivo 63x.

3. Análisis proteómico de fosfoproteínas mitóticas como sustratos potenciales de hCdc14A

Con el fin de conocer la función o funciones de hCdc14A a la salida de mitosis, así como el mecanismo molecular a través del cual hCdc14A podría participar en la segregación cromosómica, nos planteamos identificar sus posibles sustratos en esta fase del ciclo. Para ello, realizamos un análisis de proteínas cuyo nivel de fosforilación a la salida de mitosis, en serinas fosforiladas por CDKs, fuera mayor en células deficientes en hCdc14A que en células control. Nos centramos en el estudio de proteínas fosforiladas en serinas por CDKs ya que se ha descrito que las fosfatasa de la familia Cdc14 desfosforilan preferentemente residuos de este tipo (Bremmer et al., 2012). Para llevar a cabo este análisis, deplecionamos hCdc14A en células U2OS mediante el uso de siRNAs. Sincronizamos las células en prometáfase mediante tratamiento con nocodazol. Seleccionamos las células mitóticas mediante *shake off* y las liberamos en medio sin droga durante 30 min para permitir su progresión hasta anafase, momento en el que los sustratos de los complejos CDK mitóticos comienzan a ser desfosforilados para permitir la salida de mitosis. Los extractos proteicos fueron incubados con

un anticuerpo que reconoce residuos de serina fosforilados por complejos CDK y los inmunoprecipitados resultantes se resolvieron en geles bidimensionales que posteriormente fueron teñidos con tinción de plata. El número de proteínas detectadas en ambos casos fue escaso. Sin embargo, sí observamos un mayor número de proteínas en el gel correspondiente a las muestras de células deplecionadas para la fosfatasa, concretamente 17, frente al de células control, donde detectamos únicamente 6 proteínas. Por otro lado, algunas de las proteínas estaban presentes en ambos geles pero en algunos casos su intensidad (niveles de proteína) era mayor en condiciones de falta de hCdc14A. Tras comparar y analizar todas estas circunstancias, seleccionamos las proteínas de interés, aquellas que solo estaban presentes o más representadas en el gel de las células deficientes para hCdc14A. Finalmente, estas fueron identificadas mediante espectrometría de masas en la Unidad de Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer (CIC).

A partir de los resultados obtenidos se utilizó el sistema de búsqueda Mascot que consideró como resultado significativo aquellas proteínas que fueron identificadas con una puntuación superior a 65. De esta forma, obtuvimos un total de seis proteínas identificadas (Tabla 1), entre las que encontramos proteínas implicadas en diferentes funciones celulares. Algunas de ellas (PAK2 y FNIP1) participan en vías de señalización que regulan diferentes procesos celulares. PAK2 (*p21 Activated Kinase*) es una serina/treonina quinasa que, mediante fosforilación de diferentes sustratos regula diversos procesos entre los que se incluyen motilidad celular, transcripción de genes, proliferación celular, apoptosis y progresión por el ciclo celular. FNIP1 (*Folliculin Interacting Protein 1*) participa en la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR, vía que juega un papel importante en la regulación del crecimiento celular, la proliferación, la motilidad y la supervivencia celular, así como la regulación de los niveles de nutrientes y energía celulares, síntesis proteica, autofagia, transcripción y el proceso redox. Otras de las proteínas identificadas tienen funciones más específicas como PUS3 (*tRNA PseudoUridine Synthase*), proteína que participa en la síntesis de tRNA, GIMAP5 (*GTPase IMAP family member 5*), proteína de la mitocondria que participa en su integridad, o SPB7 (*SerpinB7*), proteína que inhibe enzimas proteasas y participa en la proliferación de células del glomérulo, entre otras funciones. CDCA2 (*Cell Division Cycle Associated Protein 2*) tiene funciones a la salida de mitosis, participando en la remodelación de la cromatina y en el reensamblaje de la envuelta nuclear. Mediante análisis de espectrometría de masas, se ha demostrado que estas proteínas, a excepción de GIMAP5, se encuentran fosforiladas en mitosis (Dephoure et al., 2008). De ellas, solo CDCA2 se ha caracterizado como sustrato de los complejos CDK mitóticos (Vagnarelli et al., 2011).

NOMBRE	SCORE	DESCRIPCIÓN	FUNCIÓN
PAK2	202	Quinasa serina/treonina	Participación en diferentes vías de señalización como regulación del citoesqueleto, motilidad celular, progresión por el ciclo celular, apoptosis y proliferación.
GIMAP5	197	Miembro de la familia de GTPasas IMAP	Integridad de la mitocondria.
CDCA2	96	Proteína asociada al ciclo de división celular	Regulación de la estructura de los cromosomas durante mitosis. Reensamblaje de los poros nucleares.
PUS3	86	tRNA pseudouridina sintasa	Síntesis de tRNA
FNIP1	80	Proteína de interacción con foliculina 1	Señalización por las vías AMPK y mTOR.
SPB7	76	Serpina B7	Inhibición de enzimas proteasas.

Tabla 1. Proteínas identificadas como sustratos de CDK1 y cuyos niveles de fosforilación son mayores en células deficientes en hCdc14A.

3.1 RepoMan como potencial sustrato de hCdc14A

De las proteínas identificadas en el análisis proteómico, nos centramos en CDCA2, también denominada RepoMan (Trinkle-Mulcahy et al., 2006). RepoMan se ha identificado como subunidad reguladora de las fosfatasa PP1 y PP2A (Prevost et al., 2013). Se localiza en nucleoplasma durante interfase, pasando a mostrar una localización difusa al inicio de la mitosis para finalmente acumularse en cromatina en las etapas finales de la misma (Trinkle-Mulcahy et al., 2006). Su localización y función están reguladas por procesos de fosforilación/desfosforilación. Es fosforilada al inicio de mitosis por los complejos CDK1-ciclina B1 y por Aurora B, fosforilaciones que regulan su localización en mitosis temprana (Qian et al., 2013; Vagnarelli et al., 2011). Al inicio de anafase, la desfosforilación de estos residuos es necesaria para la unión a PP1 γ y la relocalización del complejo en cromatina. Este complejo desfosforila varios residuos, entre ellos residuos en las histonas, implicados en la regulación de la arquitectura de los cromosomas y en la localización del CPC (Qian et al., 2011; Vagnarelli et al., 2011). En base a estos datos, pensamos en la posibilidad de que hCdc14A estuviera implicada en su desfosforilación a la salida de mitosis o, que incluso, hCdc14A estuviera regulada por ella.

Para comprobar esta hipótesis, además de trabajar con la forma endógena de RepoMan, utilizamos una construcción que expresa una forma etiquetada de la proteína, GFP-RepoMan. Para comprobar la funcionalidad de dicha construcción, analizamos su localización a lo largo de la mitosis. Como se muestra en la Figura 6, la localización de GFP-RepoMan es correcta, mostrándose una tinción difusa durante prometafase y metafase, y acumulándose en cromatina en anafase y telofase.

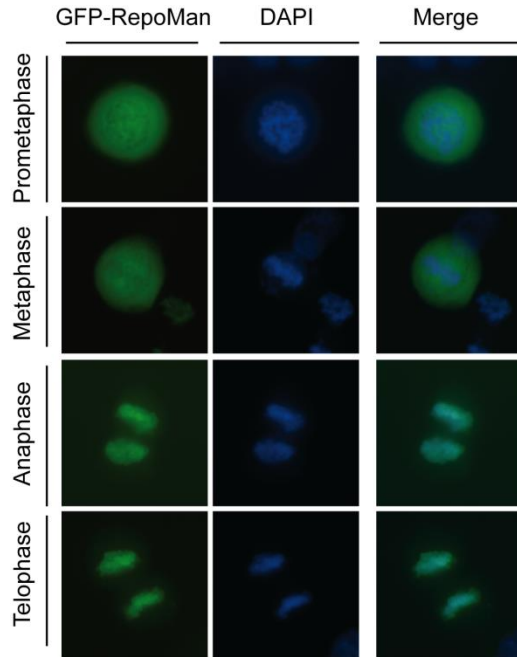


Figura 6. GFP-RepoMan muestra una localización difusa en las etapas iniciales de la mitosis y se acumula en cromatina en las etapas finales. Células U2OS fueron transfectadas con la construcción GFP-RepoMan. Tras 24 horas de transfección, las células se fijaron con paraformaldehído y los núcleos se tiñeron con DAPI. Las imágenes se adquirieron con un objetivo 40x.

Con el fin de comprobar si RepoMan es un sustrato de hCdc14A, como sugiere el análisis proteómico, analizamos en primer lugar su posible interacción mediante coimmunoprecipitación. En paralelo, también analizamos la interacción con la isoforma hCdc14B. Puesto que no es posible la detección de las isoformas de hCdc14 endógenas con los anticuerpos disponibles, utilizamos formas etiquetadas con el epítipo Myc. Como se muestra en la Figura 7, tanto Myc-hCdc14A como Myc-hCdc14B, así como sus formas inactivas, interaccionan con GFP-RepoMan.

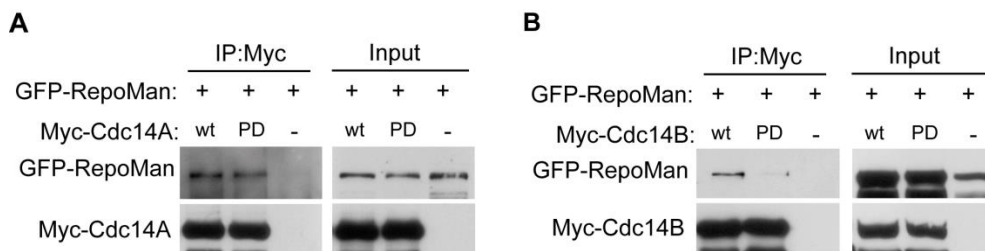


Figura 7. hCdc14A y hCdc14B interaccionan con RepoMan en condiciones de sobreexpresión. A, B) Células HEK293T fueron cotransfectadas con la construcción GFP-RepoMan junto con las formas activa o inactiva de hCdc14A (A) o hCdc14B (B) (Myc-hCdc14A, Myc-hCdc14A PD, Myc-hCdc14B y Myc-hCdc14B PD). Tras 24 horas de transfección, las células se lisaron y se inmunoprecipitaron (IP) las correspondientes formas de hCdc14 utilizando un anticuerpo anti-Myc. Los inmunoprecipitados, junto con los extractos totales (Input), se analizaron mediante *western blot* con los anticuerpos indicados.

Posteriormente, analizamos si ambas isoformas de hCdc14 eran capaces de desfosforilar a RepoMan. Para ello cotransfectamos células HEK293T con las isoformas de Myc-hCdc14 junto con GFP-RepoMan. En las células que expresan la forma activa de hCdc14A solo se observó la banda de RepoMan de mayor movilidad electroforética, correspondiente a la forma desfosforilada (Figura 8A). Estos mismos resultados también se observaron en células que expresan la forma activa de hCdc14B (Figura 8B) indicando que ambas isoformas son capaces de desfosforilar a RepoMan en condiciones de sobreexpresión.

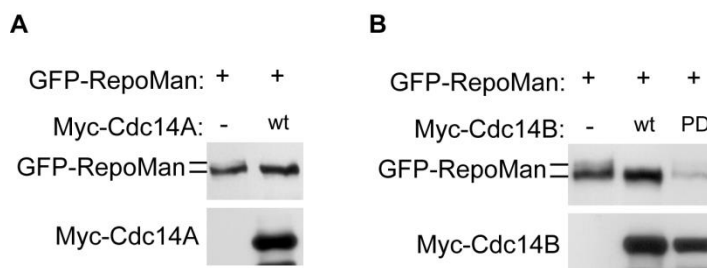


Figura 8. hCdc14A y hCdc14B desfosforilan a RepoMan en condiciones de sobreexpresión. A, B) Células HEK293T se cotransfectaron con las construcciones Myc-hCdc14A, Myc-hCdc14B o Myc-hCdc14B PD junto con GFP-RepoMan. Tras 48 horas de transfección, las células se recogieron, se lisaron y los extractos se analizaron mediante *western blot* con los anticuerpos indicados. El estado de fosforilación de RepoMan se evaluó por el cambio de movilidad electroforética. Las barras en el lateral (=) indican las formas fosforilada (banda superior) y desfosforilada (banda inferior) de la proteína.

Hemos visto que RepoMan se identifica como una de las proteínas con un nivel de fosforilación por CDK, a la salida de mitosis, mayor en células deficientes en hCdc14A que en células control. También hemos comprobado que ambas isoformas interaccionan con RepoMan siendo ambas capaces de desfosforilarlo. En base a estos datos, resultaba acertado hipotetizar que posiblemente fuese hCdc14A, o hCdc14B también, las responsables de desfosforilar a RepoMan a la salida de mitosis, regulando su interacción con PP1 γ y la localización del complejo en cromatina. Para comprobar esta hipótesis, analizamos la desfosforilación de RepoMan a la salida de mitosis en condiciones de desregulación de los niveles de hCdc14A.

En primer lugar, analizamos la cinética de desfosforilación de RepoMan en condiciones de sobreexpresión de hCdc14A. Para ello, utilizamos clones estables de U2OS que mediante el sistema inducible *Tet-Off* expresan Myc-hCdc14A o Myc-hCdc14A PD. Estas células proceden del laboratorio del Dr. Jiri Lukas (*Institute of Cancer Biology, Copenhagen*) y fueron descritas en Mailand et al., 2002. En este sistema, la presencia del antibiótico tetraciclina (T+) en el medio de cultivo reprime la expresión de Myc-hCdc14A o Myc-hCdc14A PD, mientras que su ausencia (T-) la induce. El empleo de estos clones permite una sobreexpresión rápida y homogénea de la fosfatasa en todo el cultivo en el momento deseado. Las células mitóticas, inducidas o no inducidas, y seleccionadas mediante tratamiento con NZ, fueron liberadas del bloqueo para su progresión por mitosis y recogidas a diferentes tiempos (Figura 9A). Como se observa en la

Figura 9B, la sobreexpresión de hCdc14A no alteró la cinética de desfosforilación de RepoMan a la salida de mitosis.

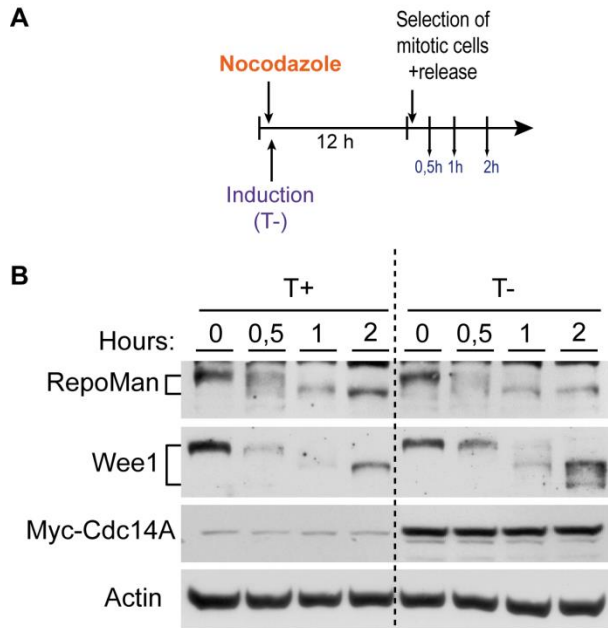


Figura 9. La sobreexpresión de hCdc14A no afecta a la cinética de desfosforilación de RepoMan a la salida de mitosis. **A)** Células U2OS Myc-hCdc14A fueron tratadas con nocodazol para permitir su bloqueo en prometafase, al mismo tiempo que se indujo (T-; medio sin tetraciclina) o no (T+; medio con tetraciclina) la expresión de hCdc14A. Tras 12 horas de inducción, se recogieron las células mitóticas por *shake off* y se liberaron en medio fresco para permitir su salida de mitosis. **B)** Se recogieron muestras a los tiempos indicados para su posterior análisis mediante *western blot* con los anticuerpos indicados.

De igual modo, analizamos la cinética de desfosforilación de RepoMan a la salida de mitosis en células deplecionadas para hCdc14A y hCdc14B con el fin de evitar que la falta de una de ellas fuese compensada con la presencia de la otra isoforma. Transfectamos células U2OS, sometidas a un primer tratamiento con timidina, con siRNAs control o siRNAs frente a hCdc14A y hCdc14B. A continuación, estas células fueron bloqueadas en G1/S mediante un segundo tratamiento de 24 horas con timidina y fueron posteriormente liberadas del bloqueo y sincronizadas en prometafase mediante tratamiento con nocodazol. Finalmente, las células mitóticas fueron liberadas del bloqueo para su progresión por mitosis y recogidas a diferentes tiempos (Figura 10A). Como se muestra en la Figura 10C, la falta de ambas isoformas (Figura 10B) no produjo un defecto o retraso en la cinética de desfosforilación de RepoMan a la salida de mitosis.

Estos resultados indican que las fosfatasa de la familia Cdc14 no son las responsables de la desfosforilación de RepoMan a la salida de mitosis, lo que sugiere que los defectos en segregación observados en células que carecen de hCdc14A no parecen estar mediados por alteraciones en la desfosforilación y, posible función, de RepoMan.

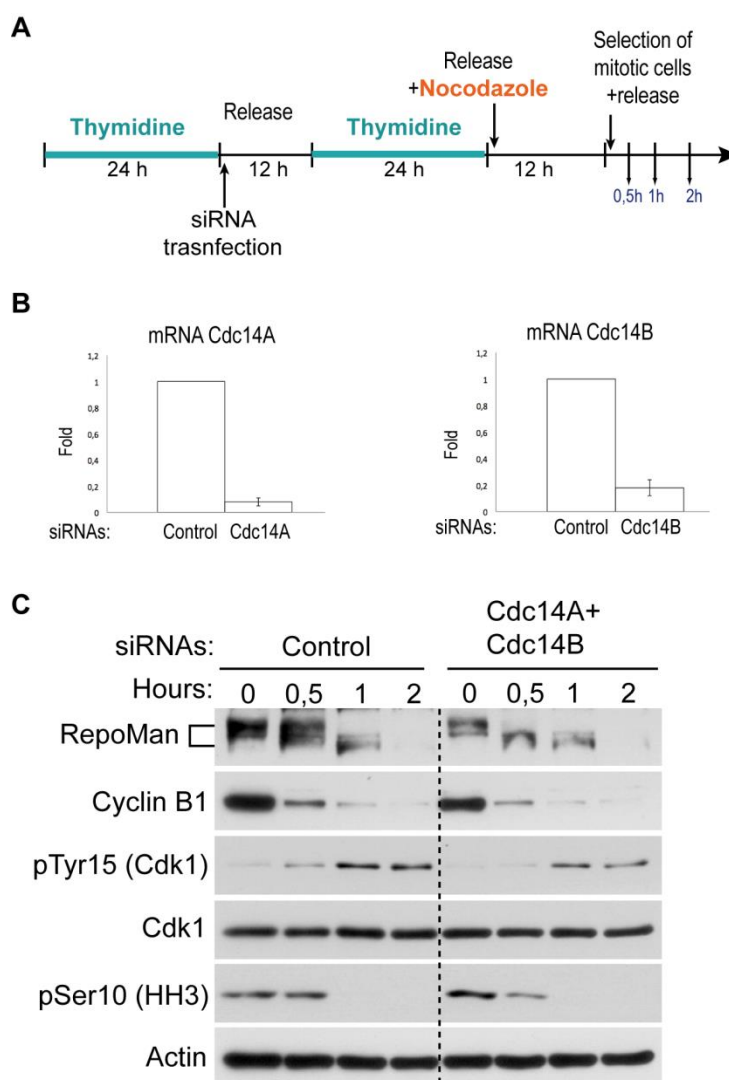
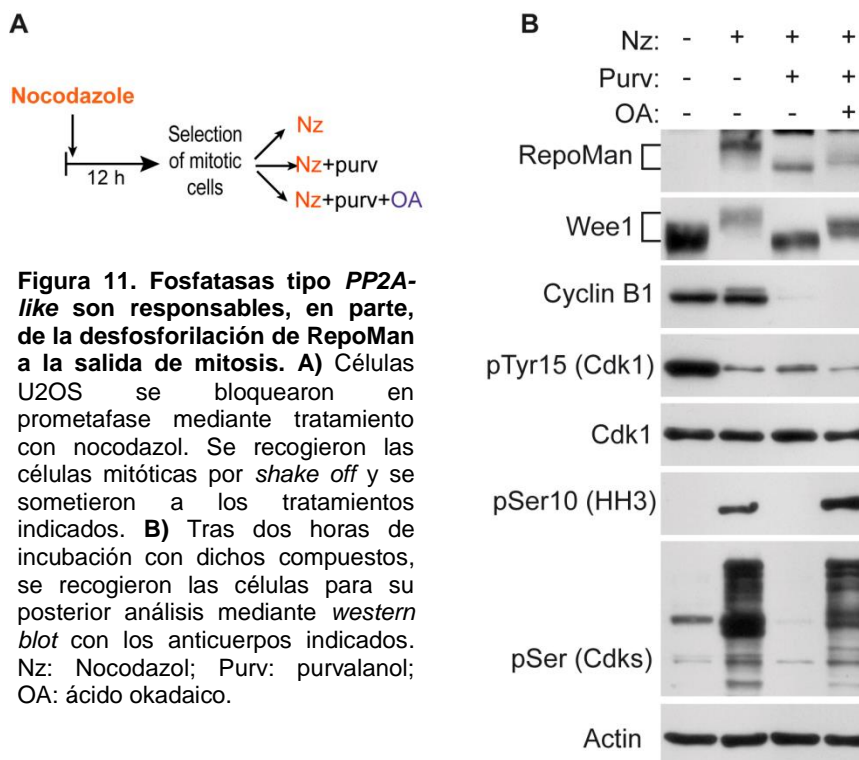


Figura 10. La falta de hCdc14A y hCdc14B no impide la desfosforilación de RepoMan a la salida de mitosis. Se sincronizaron células U2OS mediante un doble bloqueo con timidina. Entre ambos bloqueos, se transfectaron las células con siRNAs frente a hCdc14A y hCdc14B o siRNAs control. Tras la liberación del segundo bloqueo, se añadió nocodazol para permitir la acumulación de las células en prometafase. Se recogieron las células mitóticas por *shake off* y se liberaron en medio fresco para permitir su salida de mitosis (A). Se recogieron muestras a los tiempos indicados para su posterior análisis mediante *western blot* (C). La eficiencia de depleción se determinó analizando los niveles de mRNA de hCdc14A y hCdc14B mediante RT-qPCR. Se consideró valor 1 a la cantidad de mRNA de hCdc14A o hCdc14B presente en las muestras control y se refirió a ella la cantidad de mRNA presente en las células tratadas con siRNAs para hCdc14A y hCdc14B (B).

3.2 RepoMan como sustrato de fosfatasa de la superfamilia PPP

Aunque no era objetivo principal de nuestro trabajo, dado que nuestro grupo está interesado en identificar las fosfatasa implicadas en la salida de mitosis, quisimos identificar cual era la fosfatasa responsable de la regulación de RepoMan en esta fase del ciclo. En eucariotas superiores, las fosfatasa de la superfamilia PPP (concretamente PP2A y posiblemente PP1) han sido implicadas en la inactivación de los complejos CDK mitóticos y desfosforilación de gran parte de sus sustratos (Castilho et al., 2009; Mochida et al., 2009; Schmitz et al., 2010; Wu et al., 2009). Para determinar si estas fosfatasa son las responsables de desfosforilar a RepoMan en este punto del ciclo, analizamos cómo afecta su inhibición, mediante el tratamiento con ácido okadaico (OA), inhibidor de las fosfatasa *PP2A-like* (PP2A, PP4, PP5, PP3 y PP1), al estado de fosforilación de RepoMan. Para ello, células bloqueadas en mitosis mediante tratamiento con nocodazol fueron tratadas con purvalanol, un inhibidor de los complejos CDK mitóticos (Figura 11A), con el objetivo de inducir una "salida de mitosis" artificial mediada, entre otras cosas, por la degradación de Ciclina B1. En estas condiciones, la desfosforilación de sustratos de CDKs, entre ellos RepoMan, es clara (Figura 11B). Sin embargo, cuando inhibimos las fosfatasa *PP2A-like*, revertimos de forma parcial estas desfosforilaciones, incluida también la de RepoMan (Figura 11B). No podemos descartar que el tratamiento con OA tenga un efecto indirecto sobre la desfosforilación de RepoMan (y otros sustratos) como consecuencia de la inhibición de la salida de mitosis. Sin embargo, estos resultados sugieren que fosfatasa del tipo *PP2A-like* puedan ser las responsables, al menos parcialmente, de su desfosforilación a la salida de mitosis. La realización de ensayos fosfatasa *in vitro* nos permitirán confirmar este dato.



La inhibición de la actividad de las fosfatasa *PP2A-like* revierte parcialmente la desfosforilación de RepoMan a la salida de mitosis indicando que otras fosfatasa, no inhibidas por ácido okadaico, también están implicadas en su desfosforilación. Con el fin de comprobar si las fosfatasa hCdc14 son capaces de desfosforilar a RepoMan en situación de ausencia de actividad de las fosfatasa *PP2A-like*, deplecionamos ambas isoformas de hCdc14 (Figura 12B) mediante siRNAs específicos, tratando posteriormente a las células como se indica en la Figura 12A. La falta de hCdc14A y hCdc14B no incrementó el nivel de fosforilación de RepoMan resultante de la inhibición de las fosfatasa tipo *PP2A-like*, al menos en estas condiciones experimentales (Figura 12C).

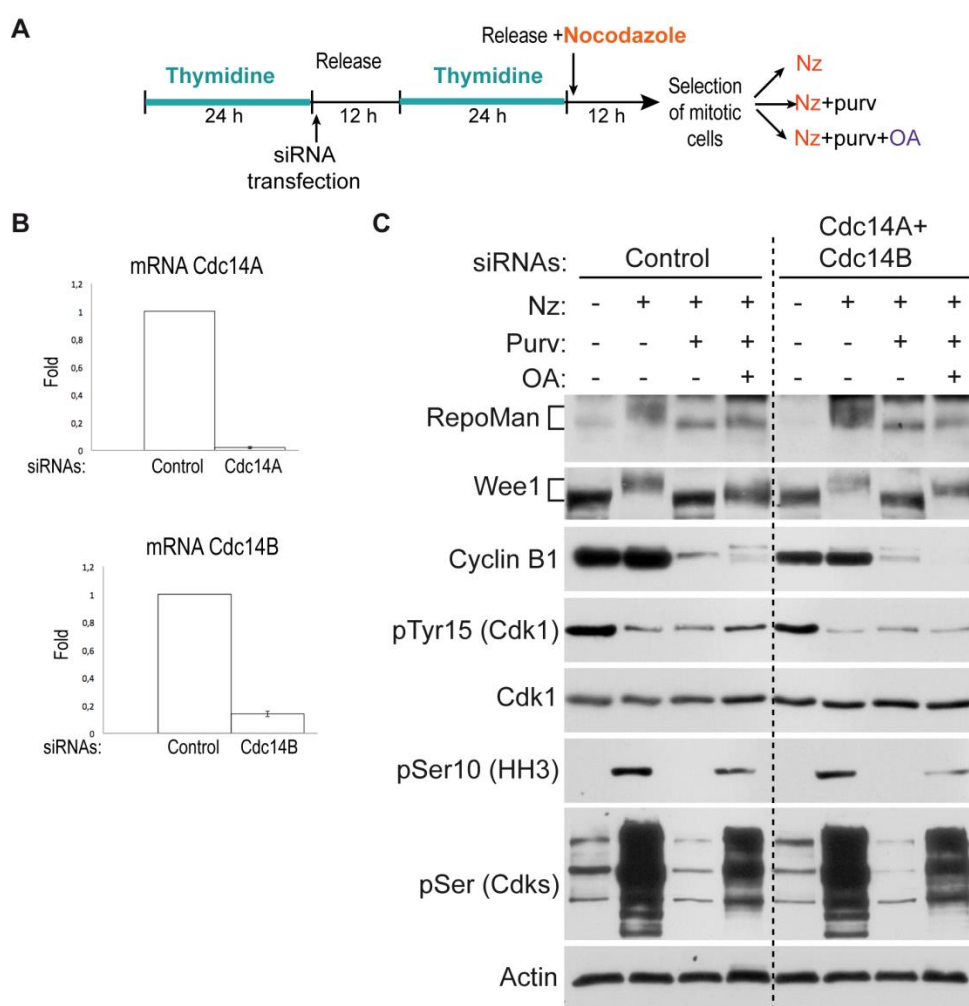


Figura 12. Las fosfatasa hCdc14 no desfosforilan a RepoMan a la salida de mitosis en ausencia de actividad de las fosfatasa *PP2A-like*. **A)** Se sincronizaron células U2OS mediante un doble bloqueo con timidina. Entre ambos bloqueos, se transfectoron las células con siRNAs frente a hCdc14A y hCdc14B o siRNAs control. Tras la liberación del segundo bloqueo, se añadió nocodazol para permitir la acumulación de las células en prometafase. Se recogieron las células mitóticas por *shake off* y se sometieron a los tratamientos indicados. **B)** La eficiencia de depleción se determinó analizando los niveles de mRNA de hCdc14A y hCdc14B mediante RT-qPCR. Se consideró valor 1 a la cantidad de mRNA de hCdc14A o hCdc14B presente en las muestras control y se refirió a ella la cantidad de mRNA presente en las células tratadas con siRNAs para hCdc14A y hCdc14B. **C)** Tras dos horas de tratamiento, se recogieron las células para su posterior análisis mediante *western blot* con los anticuerpos indicados. Nz: Nocodazol; Purv: purvalanol; OA: ácido okadaico.

Estos resultados indican que las fosfatasas tipo *PP2A-like*, responsables de desfosforilar gran parte de los sustratos de CDK a la salida de mitosis, son responsables de la desfosforilación, en parte, de RepoMan a la salida de mitosis y sugieren la existencia de otras fosfatasas también implicadas en su regulación en esta fase del ciclo, entre las que no se encuentran las fosfatasas de la familia hCdc14.

Concluimos, a partir de todos estos resultados, que hCdc14A no parece tener una función importante en la salida de mitosis puesto que la falta de la misma no impide ni retrasa la cinética de salida de mitosis. Esta ausencia de fenotipos obvios en este punto del ciclo podría deberse a que hCdc14A y hCdc14B presenten funciones redundantes de forma que la falta de una sea compensada por la otra. Hemos comprobado que la depleción de ambas mediante siRNAs tampoco presenta alteraciones detectables en la cinética de salida de mitosis. Sin embargo, la eficiencia de los siRNAs para hCdc14B, en nuestros experimentos, nunca fue completa (Figuras 10B y 12B). Por ello, para descartar su implicación en este punto del ciclo sería conveniente analizar la cinética de salida de mitosis en células KO para ambas isoformas. Se han identificado varios sustratos de hCdc14A a la salida de mitosis, y aunque solo algunos han sido validados *in vivo*, no se descarta que actúe sobre algunos de ellos regulando determinados procesos como el mantenimiento del SAC o la segregación cromosómica. La falta de esta fosfatasa tiene como consecuencia anomalías en estos procesos, indicando que puede tener una función en su regulación. Sin embargo, debido a la redundancia funcional que parece existir en metazoa entre diferentes fosfatasas, resulta difícil su estudio y llegar a conocer las funciones exactas que desempeña.

II. PARTICIPACIÓN DE hCdc14B EN LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL DNA

Para mantener la integridad del genoma, las células necesitan responder adecuadamente a distintos tipos de daño que se producen en el DNA, mediante activación de la vía de señalización que se conoce como "Respuesta a Daño en el DNA" (DDR). Esta respuesta implica la activación del *checkpoint* de daño, cuya finalidad es parar la progresión por el ciclo celular, y la reparación del daño generado. En la DDR participan numerosas quinasas encargadas de detectar el sitio donde se ha producido la lesión, reclutar diferentes proteínas implicadas en la vía y, desencadenar la parada del ciclo y reparación del daño generado, o en otros casos, conducir a senescencia o apoptosis (Geuting et al., 2013; Medema and Macurek, 2012; Zou and Elledge, 2003). La visión tradicional acerca de la función de las fosfatasa en esta ruta de respuesta consistía en que, una vez que se producía la reparación, las fosforilaciones eran revertidas por las correspondientes fosfatasa permitiendo la recuperación de las células y su reentrada en el ciclo celular. Sin embargo, el trabajo de los últimos años ha demostrado claramente que las fosfatasa son además piezas clave en la DDR por ser participantes activos tanto en el *checkpoint* de daño, como en los propios mecanismos de reparación (Freeman and Monteiro, 2010; Lee and Chowdhury, 2011).

Con respecto a hCdc14B, se le ha otorgado un papel en la activación del *checkpoint* de daño al DNA. Tras roturas de doble cadena en el DNA, ocasionadas por tratamiento con doxorubicina o radiación ionizante durante la fase G2, hCdc14B se relocaliza desde el nucléolo hacia el nucleoplasma, previa probable fosforilación por Chk1, promoviendo la desfosforilación de Cdh1 y activación del complejo APC/C^{Cdh1}, que lleva a la degradación de PLK1. La degradación de PLK1 induce estabilización de Claspin, proteína necesaria para la activación de la quinasa de *checkpoint* Chk1, y de Wee1, quinasa inhibidora de la actividad CDK. Como consecuencia final tiene lugar la inhibición de la entrada en mitosis para permitir la eficiente reparación del DNA dañado (Bassermann et al., 2008; Mocciaro et al., 2010; Peddibhotla et al., 2011). Respecto a esta posible función existe controversia ya que estos resultados, obtenidos en células humanas deplecionadas mediante siRNAs para hCdc14B, no se corroboran en otros tipos de líneas celulares KO para la fosfatasa, en las cuales se observa un *checkpoint* de daño al DNA funcional, capaz de sensar y arrestar las células antes de la entrada en mitosis (Mocciaro et al., 2010). Sin embargo, estas células presentan mayor número de focos de daño que células control, incluso en condiciones basales o ausencia de daño exógeno, indicando deficiencias en el proceso de reparación y sugiriendo un posible papel para hCdc14B en este proceso (Mocciaro et al., 2010).

Dada la importancia de la DDR en el mantenimiento de la estabilidad genómica, y el escaso conocimiento sobre las fosfatasa implicadas en ella, nuestro segundo objetivo fue estudiar la posible función de hCdc14B en la respuesta a daño en el DNA, analizando su potencial implicación tanto en el *checkpoint* de daño al DNA como en el proceso de reparación.

1. Análisis de la localización subcelular de hCdc14B frente a diferentes tipos de estrés

Se ha descrito que la fosfatasa hCdc14B sale del nucléolo hacia el nucleoplasma ante estrés genotóxico producido por doxorubicina o radiación ionizante (Bassermann et al., 2008; Mocciaro et al., 2010; Peddibhotla et al., 2011). Ambos tratamientos producen roturas de doble cadena en el DNA (DSBs). Con el fin de comprobar si esta traslocación de hCdc14B es un mecanismo general frente a diferentes tipos de estrés, analizamos la localización subcelular de la fosfatasa etiquetada con la proteína verde fluorescente (GFP-hCdc14B) en células U2OS y RPE tras someterlas a diferentes tratamientos. Utilizamos hidroxiurea (HU) que genera estrés replicativo al inhibir la ribonucleótido reductasa e impedir la síntesis de DNA, cloruro sódico (NaCl) que produce estrés osmótico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) agente inductor de estrés oxidativo que, a altas concentraciones como las utilizadas en los experimentos, induce roturas de doble cadena en el DNA. Como resultado de estos experimentos, no observamos un cambio de localización claro de hCdc14B tras el tratamiento con los agentes que generan estrés replicativo (HU) o estrés osmótico (NaCl). Sin embargo, sí observamos translocación de hCdc14B desde el nucléolo hacia el nucleoplasma tras estrés oxidativo producido por el tratamiento con H_2O_2 (Figura 13). Estos resultados se han corroborado en células no tumorales, concretamente en la línea celular RPE. Los datos anteriormente citados así como los obtenidos en estos experimentos indican que, tras daño en el DNA ocasionado por agentes genotóxicos que producen roturas de doble cadena, hCdc14B sale desde el nucléolo hacia el nucleoplasma, sugiriendo su implicación en la DDR frente a este tipo de lesiones.

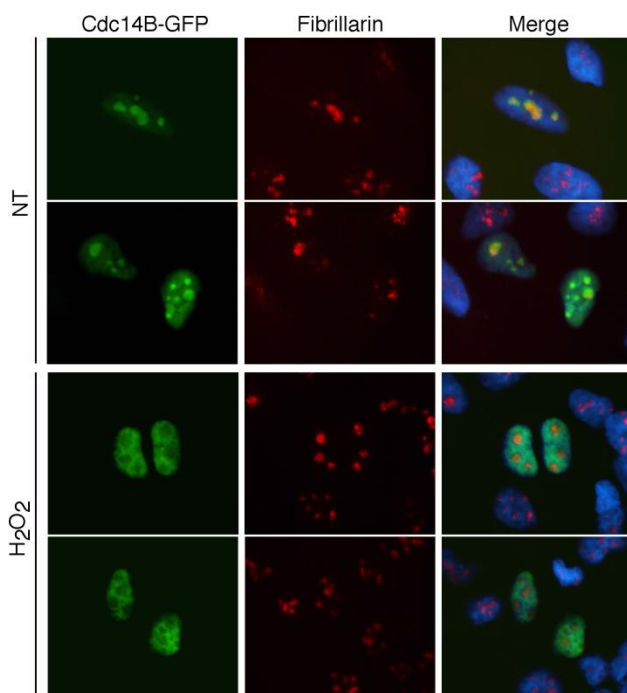


Figura 13. hCdc14B sale del nucléolo hacia el núcleo en respuesta a estrés oxidativo. Células U2OS se transfectaron con la construcción hCdc14B-GFP. Tras 24 horas de transfección, las células se sometieron a un pulso de 1 hora con peróxido de hidrógeno (1mM). Una hora después del pulso se fijaron con paraformaldehído y se llevó a cabo inmunofluorescencia con un anticuerpo frente al marcador nucleolar fibrilarina. Los núcleos se tiñeron utilizando DAPI. Las imágenes se adquirieron con un objetivo 40x. NT: Non Treated.

2. Análisis de la posible implicación de hCdc14B en la respuesta al daño en el DNA

Para estudiar la posible función de hCdc14B en la respuesta a daño en el DNA, analizamos la activación del *checkpoint* de daño así como la reparación del daño generado en el DNA, tras el tratamiento con doxorubicina o peróxido de hidrógeno, en condiciones de desregulación de la fosfatasa.

En primer lugar, analizamos si la falta de hCdc14B produce defectos en la DDR tras someter a las células a estrés oxidativo agudo mediante tratamiento con H₂O₂. Utilizamos células HCT116 (*Human colon cancer*) KO para hCdc14B (HCT116 hCdc14B^{-/-}), y como control células HCT116 hCdc14B^{flox/flox} que presentan ambos alelos con el exón 2 flanqueado por sitios *loxP* siendo ambos funcionales. Estas células fueron descritas en el artículo Berdougou et al., 2008 y cedidas por el grupo del Dr. Jallepalli (*Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NY*). Dichas células se sometieron a una hora de tratamiento con peróxido de hidrógeno, que a la concentración utilizada en estos experimentos (1mM), produce roturas de doble cadena en el DNA. Analizamos la activación del *checkpoint* de daño al DNA mediante análisis por *western blot* de la fosforilación en el residuo Ser³¹⁷ de Chk1, necesaria para la activación de esta quinasa de *checkpoint*. Igualmente analizamos los niveles de Wee1, quinasa que se estabiliza tras daño en el DNA para contribuir a la inhibición de los complejos CDK y parar la progresión por el ciclo. Para el análisis del proceso de reparación, determinamos los niveles de daño presentes en el DNA a lo largo del tiempo mediante la detección de la fosforilación en el residuo Ser¹³⁹ de H2AX (γ H2AX), marcador de roturas de doble cadena. Como se muestra en la Figura 14A, las células carentes de hCdc14B muestran menores niveles de fosforilación de Chk1 sugiriendo que aunque sí activan el *checkpoint*, lo activan de forma menos eficiente respecto a células control. Además, los niveles de Wee1 son menores que en las células control en todos los tiempos analizados. Sin embargo, esta menor fosforilación y activación de Chk1, así como la menor acumulación de Wee1, no tienen como consecuencia una parada menos eficiente del ciclo en G2 (Figura 14B). Estos resultados sugieren que estas células deficientes en hCdc14B no tienen defectos en el *checkpoint* de daño al DNA. Por otro lado, con respecto a la cinética de reparación del daño, observamos que los niveles de γ H2AX son mayores que en las células control en todos los tiempos analizados, sugiriendo que el proceso de reparación es menos eficiente en estas células (Figura 14A). Estos mayores niveles de γ H2AX en los diferentes tiempos analizados también se observaron en células deplecionadas para hCdc14B mediante el uso de siRNAs específicos para la fosfatasa (datos no mostrados), aunque de forma menos destacada, debido probablemente, a una eficiencia no total de los siRNAs.

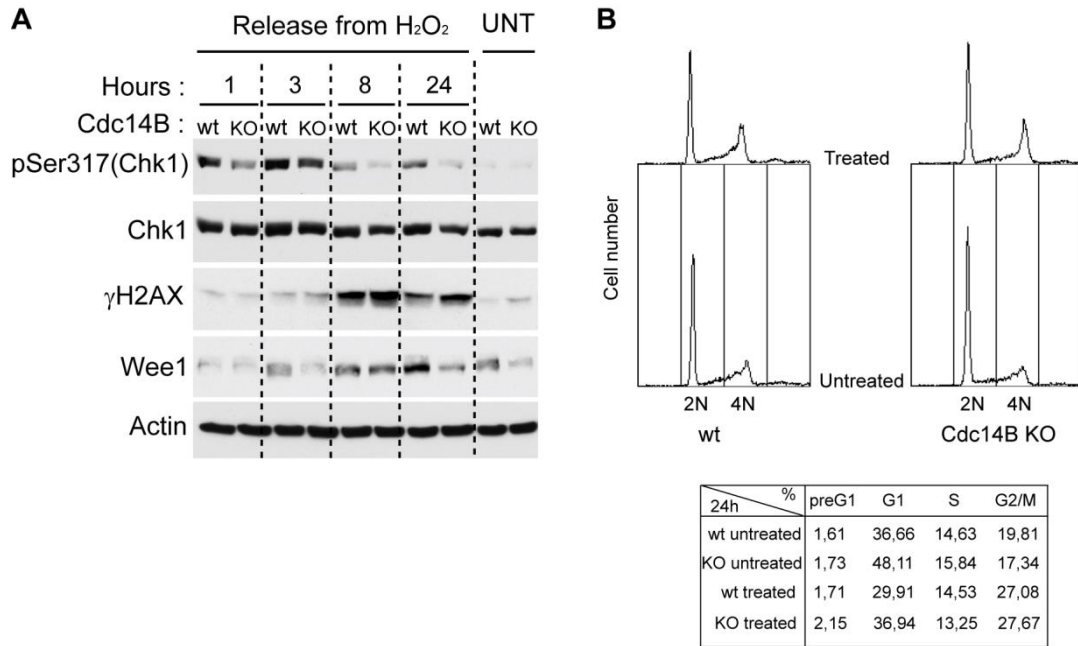


Figura 14. Células hCdc14B^{-/-} presentan deficiencias en la respuesta a daño en el DNA tras estrés oxidativo. A) Células deficientes en hCdc14B (KO) y células control (wt) se sometieron a un pulso de una hora con peróxido de hidrógeno (1mM). Tras el pulso, se recogieron muestras a los tiempos indicados para su posterior análisis mediante *western blot*. **B)** Las muestras correspondientes a las células sin tratar y a 24 horas después del tratamiento se analizaron mediante citometría de flujo. UNT: Untreated.

Con el fin de comprobar que estos resultados no son específicos del tratamiento con peróxido de hidrógeno, realizamos el mismo tipo de análisis tras tratamiento de las células con doxorubicina, agente genotóxico inductor de roturas en la doble cadena del DNA. En este caso, también observamos que las células carentes de hCdc14B muestran menor fosforilación y, por lo tanto, menor activación de Chk1, junto con menor estabilización de Wee1 tras daño así como mayores niveles de daño tras ocho horas de tratamiento (Figura 15).

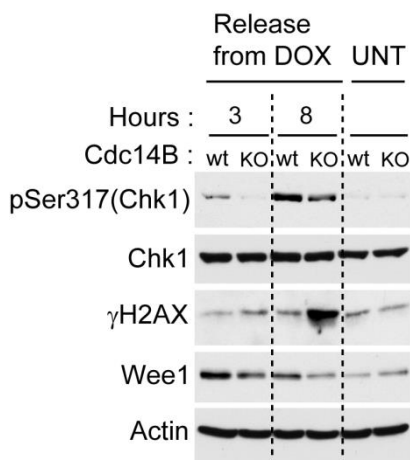


Figura 15. Células hCdc14B^{-/-} presentan deficiencias en la respuesta a daño en el DNA tras tratamiento con doxorubicina. Células deficientes en hCdc14B (KO) y células control (wt) se sometieron a un pulso de una hora con doxorubicina (2,5 μM). Tras el pulso, se recogieron muestras a los tiempos indicados para su posterior análisis mediante *western blot*. UNT: Untreated; DOX: Doxorubicin.

En condiciones de ausencia de daño exógeno, observamos que tanto las células mitóticas deficientes en hCdc14B como las células control presentan focos de γ H2AX correspondientes posiblemente a regiones de DNA no replicadas de forma completa, o a fallos en la reparación del daño ocasionado por procesos celulares endógenos. En estas condiciones, si bien el porcentaje de células mitóticas positivas para este marcador es muy similar entre células deficientes en hCdc14B y células control, el número de focos de γ H2AX es mayor en las células carentes de la fosfatasa que en las control, lo que indica posibles deficiencias en el proceso de reparación (Figura 16B y C). El hecho de que estas células carentes de hCdc14B con lesiones en su DNA lleguen a mitosis, indica que el *checkpoint* no es suficientemente eficiente o que el daño que observamos no alcanza el límite necesario para la activación de este último. Probablemente se trate de esta segunda opción ya que el número de focos observado en estas células mitóticas es inferior a 20, número considerado como mínimo para que un *checkpoint* funcional se active (Deckbar et al., 2007; Mocciaro et al., 2010).

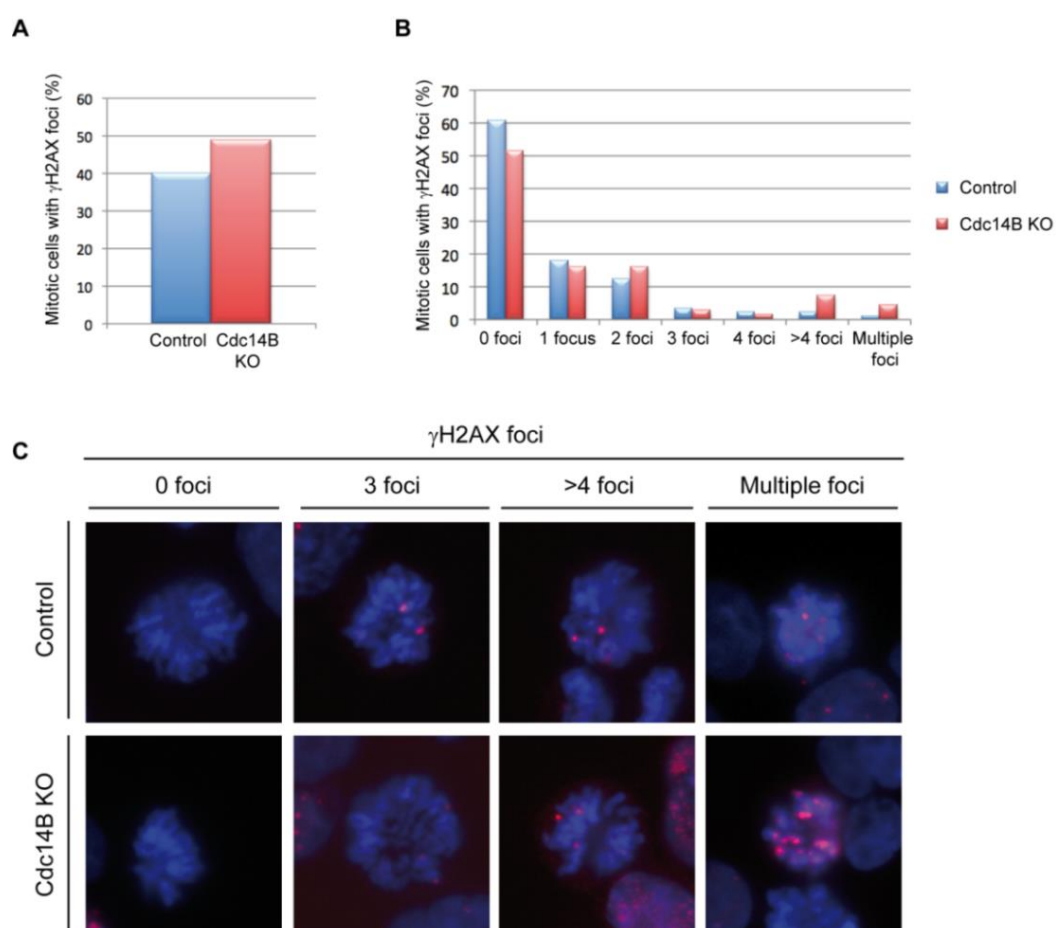


Figura 16. Células mitóticas deficientes en hCdc14B presentan mayor acumulación de focos de daño que células control. A, B, C) Cultivos asincrónicos de células deficientes en hCdc14B (KO) y células control se fijaron con metanol. A continuación, se analizaron por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo frente al marcador de daño γ H2AX. Las imágenes se adquirieron con un objetivo 40x. Se contó el número de células mitóticas positivas para γ H2AX y el número de focos de γ H2AX por célula mitótica en un total de 120 células en cada caso.

Hemos mostrado que la falta de hCdc14B produce deficiencias en la respuesta a daño en el DNA. Nos planteamos la posibilidad de que, por el contrario, niveles altos de hCdc14B favorecieran la DDR. Para analizar esta posibilidad, utilizamos clones estables de células HeLa que expresan hCdc14B o su forma inactiva (hCdc14B PD) en un sistema dependiente de doxiciclina (TetON), de modo que ante la presencia de la misma en el medio se induce la expresión ectópica de la proteína. De forma previa al trabajo con estos clones analizamos los niveles de expresión tras inducción con doxiciclina a diferentes tiempos, así como la localización de la proteína ectópica, corroborando que esta es correcta y que los niveles de proteína no afectaban a la progresión por el ciclo celular. Tras doce horas de inducción, las células fueron sometidas al tratamiento con doxorubicina o peróxido de hidrógeno en las mismas condiciones que las descritas previamente (Figura 17A). Como control se utilizaron las mismas células en condiciones de no inducción de la fosfatasa. Observamos que las células que sobreexpresan la forma activa de hCdc14B presentan mayores niveles de fosforilación de Chk1 (Figura 17B y D) así como una mayor acumulación de células en G2 (Figura 17C), indicativo de una mayor eficiencia en la activación del *checkpoint* de daño al DNA. Además, en estas células, también se observan menores niveles de γ H2AX a lo largo del tiempo con respecto a células control (Figura 17B y D). Estos datos sugieren que altos niveles de hCdc14B favorecen la activación del *checkpoint* así como los mecanismos de reparación de la célula.

Estos resultados los corroboramos también a nivel celular mediante el análisis por inmunofluorescencia a diferentes tiempos del número de focos de γ H2AX en células que sobreexpresan o no la proteína de fusión hCdc14B-GFP y sometidas a tratamiento con doxorubicina o peróxido de hidrógeno (Figura 17E).

Con objeto de comprobar si el efecto observado en las células que sobreexpresan hCdc14B depende de su actividad catalítica, realizamos el mismo tipo de análisis en células que sobreexpresan la forma inactiva de la fosfatasa. Como se muestra en la Figura 18, la sobreexpresión de la forma inactiva no afecta la eficiencia de activación del *checkpoint* ni del proceso de reparación, indicando que estos efectos son dependientes de la actividad fosfatasa de hCdc14B (Figura 18B y D).

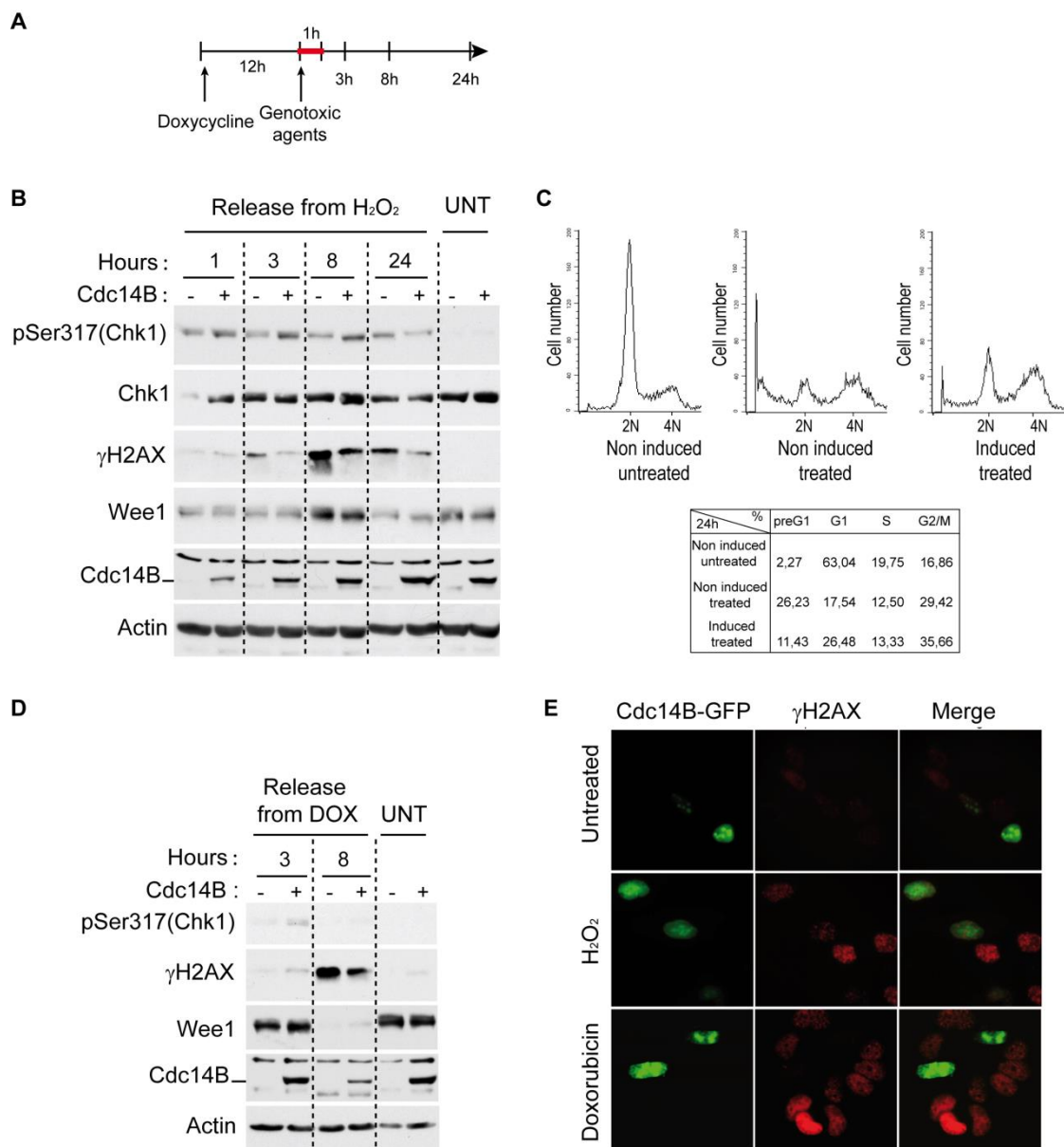


Figura 17. Células que sobreexpresan hCdc14B muestran mayor eficiencia en la DDR.

A, B, D) Células HeLa Tet-ON-hCdc14B fueron tratadas, o no (condiciones control), con doxiciclina para inducir la expresión de hCdc14B. Tras doce horas, las células, inducidas y no inducidas, se sometieron a un pulso de una hora con peróxido de hidrógeno (1mM) o doxorubicina (2,5 μM). Se recogieron muestras a los tiempos indicados para su posterior análisis mediante *western blot* con los anticuerpos indicados. **C)** Las muestras correspondientes a las células sin tratar y a 24 horas después del tratamiento con peróxido de hidrógeno se analizaron también mediante citometría de flujo. **E)** Células U2OS se transfectoron con la construcción hCdc14B-GFP. Tras 24 horas de transfección, las células se sometieron a un pulso de una hora con peróxido de hidrógeno o doxorubicina y tras tres horas acabado el tratamiento, se fijaron con paraformaldehído. Se llevó a cabo inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo frente al marcador de daño γH2AX y los núcleos se tiñeron con DAPI. Las imágenes se adquirieron con un objetivo 40x. Estos mismos resultados se obtuvieron en células no tumorales RPE. UNT: Untreated; DOX: Doxorubicin.

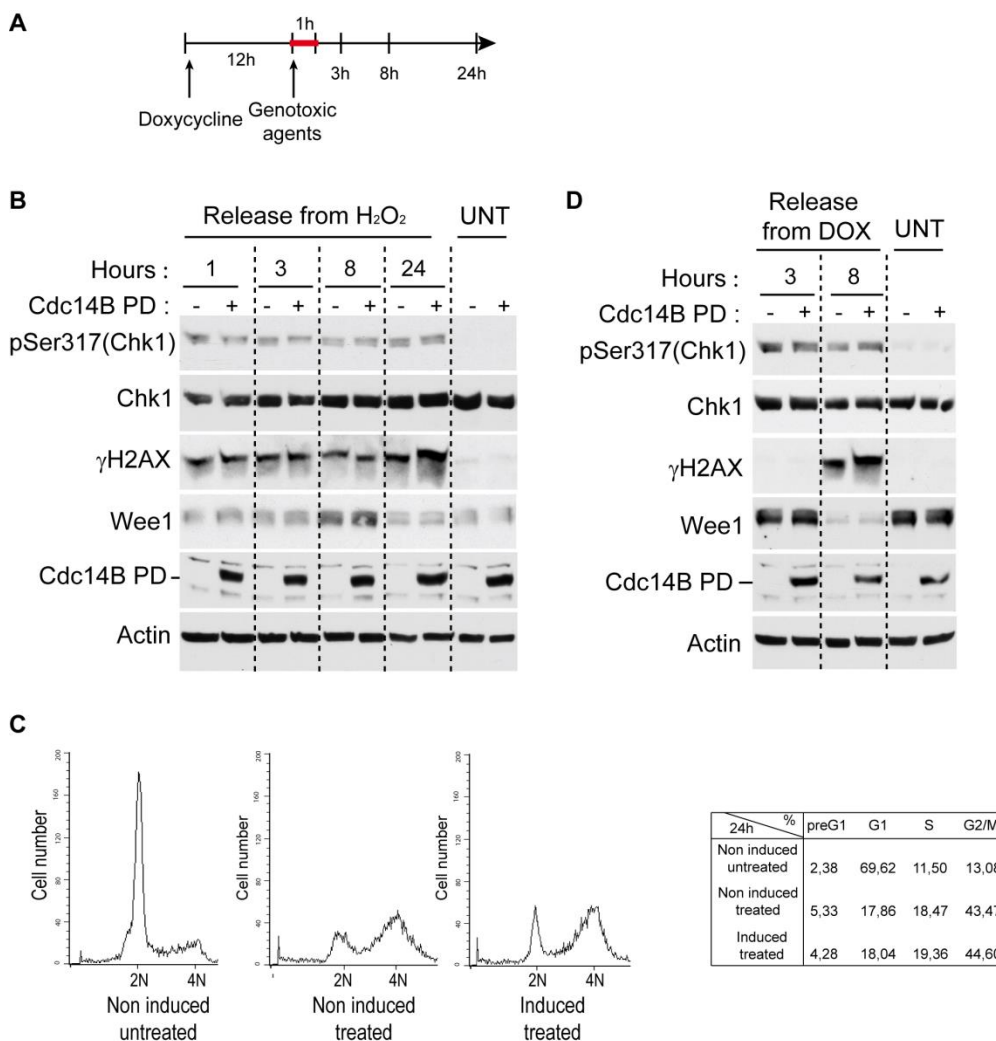


Figura 18. La sobreexpresión de hCdc14B PD no afecta a la DDR. A, B, D) Células HeLa Tet-ON-hCdc14B PD fueron tratadas, o no (condiciones control), con doxiciclina para inducir la expresión de hCdc14B PD. Tras doce horas, las células, inducidas y no inducidas, se sometieron a un pulso de una hora con peróxido de hidrógeno (1mM) o doxorubicina (2,5 μM). Se recogieron muestras a los tiempos indicados para su posterior análisis mediante *western blot* con los anticuerpos indicados. **C)** Las muestras correspondientes a las células sin tratar y a 24 horas después del tratamiento con peróxido de hidrógeno se analizaron también mediante citometría de flujo. UNT: Untreated; DOX: Doxorubicin.

Nuestros resultados muestran que las células que sobreexpresan la forma activa de hCdc14B presentan mayor eficiencia en la activación del *checkpoint* tras daño en el DNA y mayor eficiencia en la reparación del daño generado. Se ha descrito que células que sobreexpresan altos niveles de hCdc14B presentan un retraso a la entrada en mitosis relacionado con inhibición de la actividad de CDK1 por desfosforilación de las fosfatasa activadoras hCdc25 (Tumurbaatar et al., 2011). Esta extensión de la fase G2 podría llevar a una mayor eficiencia de los procesos de reparación (Dekanty et al., 2014). En nuestros experimentos, los niveles de expresión de hCdc14B son relativamente bajos, por lo que no hemos observado un retraso a la entrada en mitosis (Figura 19A) ni tampoco un efecto obvio sobre la actividad de CDK1, lo que se reflejaría en un mayor grado de fosforilación en el

residuo Tyr¹⁵ de CDK1 respecto a células control (Figura 19B). Estos datos sugieren que los efectos observados con la sobreexpresión de hCdc14B no son consecuencia de un efecto previo en la progresión por el ciclo celular.

Analizamos también el efecto sobre la DDR de la sobreexpresión del homólogo hCdc14A, con niveles de proteína capaces de inhibir la actividad CDK y retrasar la entrada en mitosis (Vazquez-Novelle et al., 2010). Para ello, utilizamos clones estables de U2OS que mediante el sistema inducible *Tet-Off* expresan Myc-hCdc14A o Myc-hCdc14A PD. En este sistema, la presencia del antibiótico tetraciclina (T+) en el medio de cultivo reprime la expresión de Myc-hCdc14A o Myc-hCdc14A PD, mientras que su ausencia (T-) la induce. Tras doce horas de inducción de la proteína, las células fueron sometidas al tratamiento con doxorubicina o peróxido de hidrógeno en las mismas condiciones que las descritas previamente (Figura 18A), utilizando como control las mismas células en condiciones de no inducción de la fosfatasa. En este caso, no observamos que la sobreexpresión de la forma activa de hCdc14A produzca ningún efecto sobre la activación de Chk1 ni que la eficiencia de reparación sea mayor en estas células respecto a células control (Figura 20). Por el contrario, células que sobreexpresan hCdc14A presentan mayores niveles de γ H2AX a lo largo del tiempo respecto a células control. Estos resultados sugieren que la mayor eficiencia en la activación del *checkpoint* y en el proceso de reparación observados en células que sobreexpresan hCdc14B, son funciones específicas de esta fosfatasa y no son consecuencia indirecta de su efecto en la progresión por el ciclo celular.

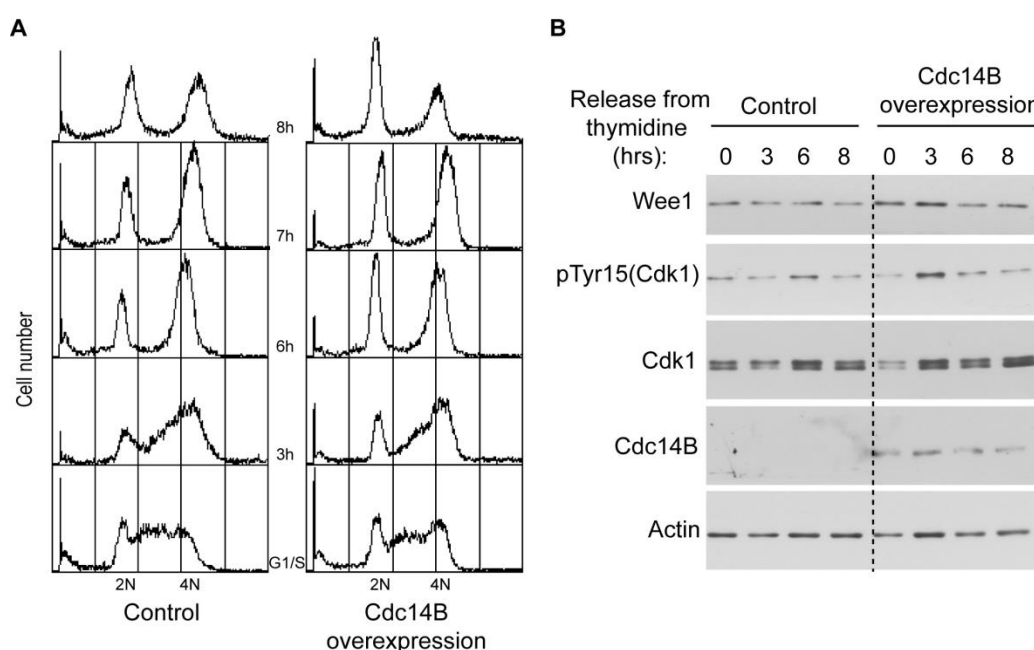


Figura 19. Análisis de los niveles de sobreexpresión de hCdc14B y su efecto en la progresión por G2/M. A, B) Células Hela Tet-ON-hCdc14B fueron bloqueadas en G1/S mediante tratamiento con timidina (24hrs) al mismo tiempo que se inducía o no (control) la expresión de hCdc14B. Tras la liberación del bloqueo, se recogieron muestras a los tiempos indicados para su posterior análisis mediante citometría de flujo y *western blot* con los anticuerpos indicados.

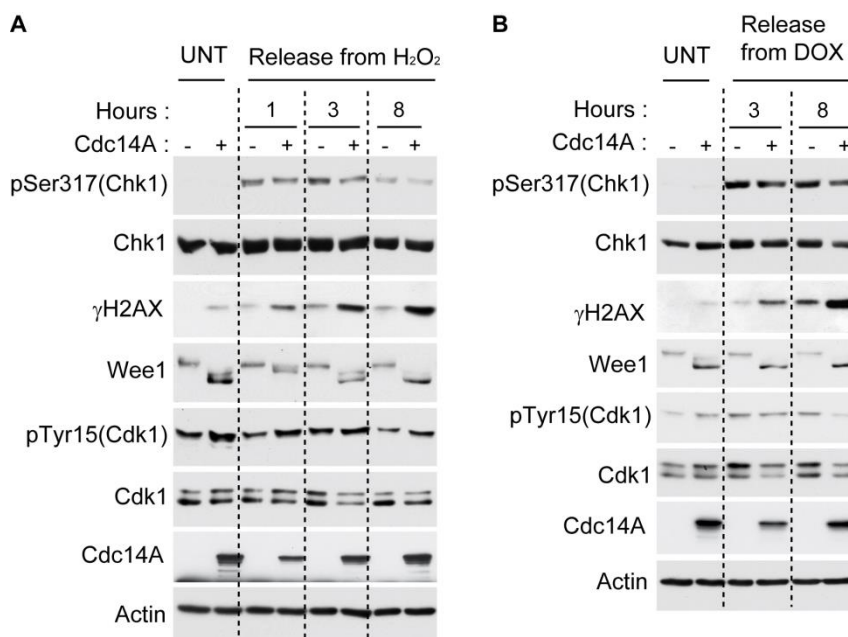


Figura 20. Análisis de la DDR en células que sobreexpresan hCdc14A. A, B) Células U2OS-Myc-hCdc14A que expresan la proteína de forma inducible mediante el sistema Tet-Off, se crecieron en ausencia o presencia de tetraciclina para inducir o no la expresión de hCdc14A respectivamente. Tras doce horas, las células, inducidas y no inducidas, se sometieron a un pulso de una hora con peróxido de hidrógeno (1mM) o doxorubicina (2,5 μM). Se recogieron muestras a los tiempos indicados para su posterior análisis mediante *western blot* con los anticuerpos indicados. UNT: Untreated; DOX: Doxorubicin.

Todos estos resultados sugieren que hCdc14B participa, en cierta medida, en la activación del *checkpoint* tras daño en el DNA e, igualmente, participa en el proceso de reparación.

3. Implicación de hCdc14B en la viabilidad celular tras el tratamiento con el agente genotóxico doxorubicina

Las células que presentan deficiencias en la respuesta a daño en el DNA reparan el daño generado con menor eficiencia, causando acumulación del mismo, de tal forma que, cuando los niveles son elevados se puede desencadenar muerte celular. Hemos observado que células carentes de hCdc14B presentan una reparación menos eficiente del daño generado, mientras que en células con sobreexpresión de la forma activa de la fosfatasa, se observa el efecto contrario. Estos resultados sugieren que la falta de hCdc14B incrementaría la sensibilidad de las células a agentes genotóxicos y que, por el contrario, altos niveles de la fosfatasa (o superiores a los endógenos) inducirían resistencia a estos. Para comprobar esta posibilidad, analizamos la sensibilidad al tratamiento con doxorubicina en ambas condiciones.

En primer lugar, analizamos la muerte celular tras el tratamiento con doxorubicina en condiciones de falta de hCdc14B. Las células fueron transfectadas con siRNAs control o frente a hCdc14B y posteriormente fueron sometidas a un tratamiento continuo con el agente genotóxico doxorubicina (Figura 21A). Tras 24 horas de tratamiento, analizamos el porcentaje de muerte celular mediante el uso del colorante *Tripán Blue* que solo penetra y tiñe las células muertas debido a la porosidad de sus membranas. Las células deficientes en hCdc14B (Figura 21B) presentaron mayor porcentaje de muerte celular que las células control, indicando que efectivamente se trata de células más sensibles a dicho agente genotóxico (Figura 21C y D). Sin embargo, no observamos diferencias entre células HCT116 hCdc14B^{-/-} y células HCT116 hCdc14B^{fllox/fllox} sometidas al mismo tratamiento. Es posible que las células que carecen de forma constitutiva de hCdc14B, aunque presentan deficiencias en el proceso de reparación, puedan haber desarrollado mecanismos adicionales para sobrevivir en presencia de daño.

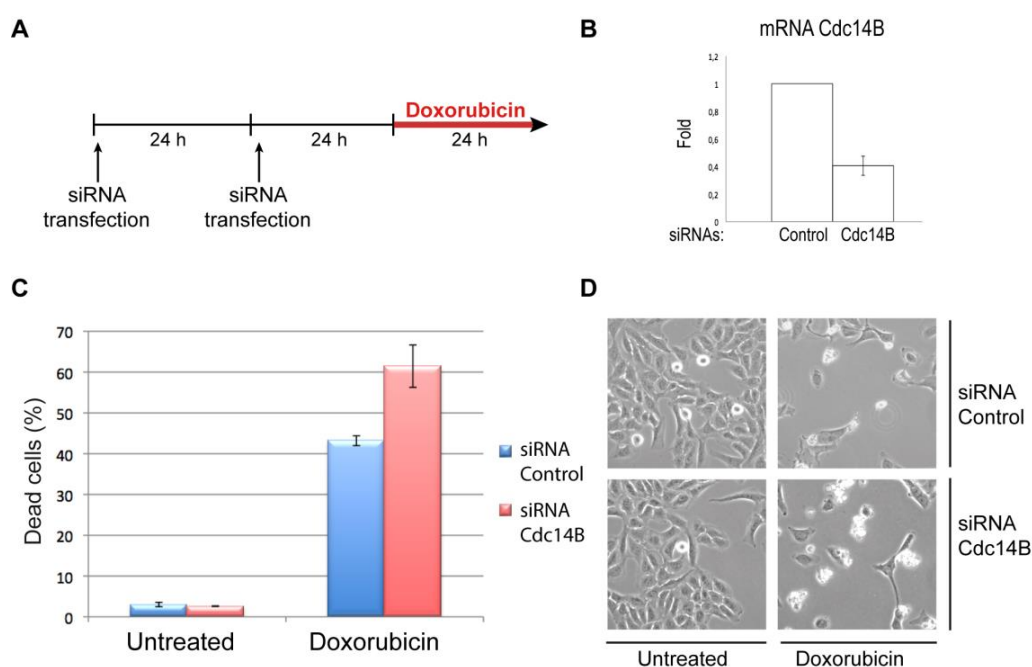


Figura 21. Células deficientes en hCdc14B presentan mayor porcentaje de muerte celular tras tratamiento con doxorubicina. **A)** Células U2OS se transfectaron con siRNAs frente a hCdc14B o siRNAs control. Tras 48 horas de transfección, las células se sometieron a un tratamiento continuo con doxorubicina (2,5 μ M) durante 24 horas. **B)** La eficiencia de depleción se determinó analizando los niveles de mRNA de hCdc14B mediante RT-qPCR. Se consideró valor 1 a la cantidad de mRNA de hCdc14B presente en las muestras control y se refirió a ella la cantidad de mRNA presente en las células tratadas con siRNAs para hCdc14B. **C, D)** Se recogieron las células y se analizó el porcentaje de muerte celular mediante tinción con *Tripán blue* que permite diferenciar entre las células vivas y las células muertas. UNT: Untreated; DOX: Doxorubicin.

También analizamos la sensibilidad al tratamiento genotóxico de células que sobreexpresan la forma activa o inactiva de la fosfatasa. Utilizamos los clones inducibles anteriormente descritos. Tras doce horas de inducción de hCdc14B o hCdc14B PD, las células se sometieron al tratamiento con doxorubicina (Figura 22A). Como se observa en la Figura 22C, las células que sobreexpresan la forma activa de hCdc14B presentan menor sensibilidad al tratamiento, reflejado en un porcentaje de muerte celular menor que el de células control, mientras que las células que sobreexpresan la forma inactiva presentan un porcentaje de muerte celular similar al de células control.

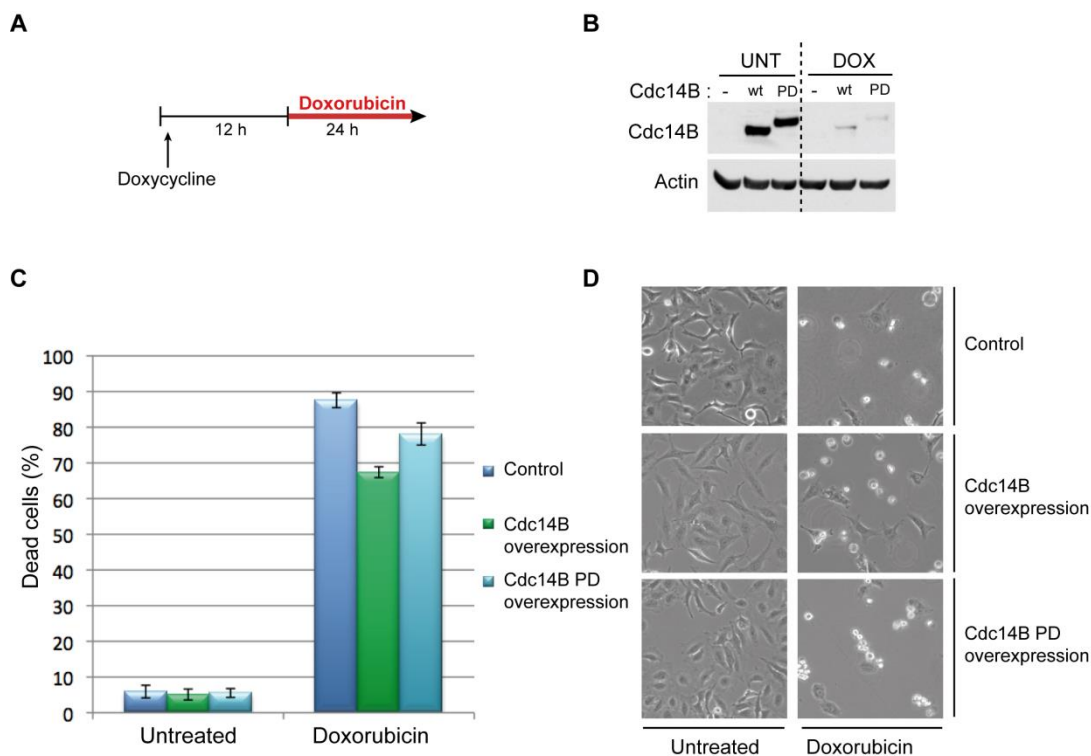


Figura 22. Células que sobreexpresan la forma activa de hCdc14B presentan menor muerte celular tras tratamiento con doxorubicina. A, B) Células HeLa Tet-ON-hCdc14B y células HeLa Tet-ON hCdc14B PD fueron tratadas con doxiciclina para inducir la expresión de hCdc14B o hCdc14B PD. Tras doce horas, estas células junto con células HeLa Tet-ON (control) se sometieron a un tratamiento continuo con doxorubicina (2,5 μ M) durante 24 horas. **C, D)** Se recogieron las células y se analizó el porcentaje de muerte celular mediante tinción con *Tripan blue* que permite diferenciar entre las células vivas y las células muertas. UNT: Untreated; DOX: Doxorubicin.

Estos resultados indican que los niveles de hCdc14B en la célula influyen en la respuesta frente a daño en el DNA, lo que sugiere su implicación en la DDR.

4. Estudio de la implicación de hCdc14B en los procesos de reparación

Nuestros resultados muestran que variaciones en los niveles de hCdc14B afectan al proceso de reparación y también a la supervivencia celular, lo que sugiere que la fosfatasa puede estar implicada en las rutas de reparación del daño. Para estudiar la posible implicación de hCdc14B en alguna de las dos vías principales de reparación de roturas de doble cadena en el DNA, consistentes en la recombinación homóloga (*HR*) o la unión de extremos no homólogos (*NHEJ*), analizamos la eficiencia de ambas vías de reparación en condiciones de desregulación de hCdc14B. Para estos análisis utilizamos ensayos de fluorescencia *in vivo* basados en la transfección de las células con plásmidos portadores del gen GFP. En ellos, la expresión de la proteína GFP, tras ser sometidos a hidrólisis por una endonucleasa específica de forma previa a la transfección de las células, solo dependerá de su exitosa reparación vía HR o NHEJ, según el plásmido de que se trate.

En primer lugar, analizamos la eficiencia de reparación en células deficientes en hCdc14B. Para ello, linealizamos los plásmidos portadores del gen GFP mediante digestión con las enzimas I-SceI o HindIII para el análisis de las vías HR y NHEJ, respectivamente. Células HCT116 hCdc14B^{-/-} y HCT116 hCdc14B^{flox/flox} fueron transfectadas con los plásmidos linealizados (GFP negativos) junto con un plásmido, pDsRed, que emite fluorescencia roja y sirve como control de transfección. Tras 24 horas de transfección, analizamos la emisión de fluorescencia mediante citometría de flujo. Estos ensayos muestran que la falta de hCdc14B tiene como consecuencia una reducción significativa de la eficiencia de reparación por HR, siendo este efecto menos destacado en la vía NHEJ (Figura 23A y B). En el caso de células deplecionadas para hCdc14B mediante siRNAs (Figura 24A y B), se observa una ligera reducción en la eficiencia de la HR, sin efecto obvio sobre la NHEJ (Figura 24C y D), debido probablemente a que en estos experimentos la depleción de hCdc14B no fue muy eficiente.

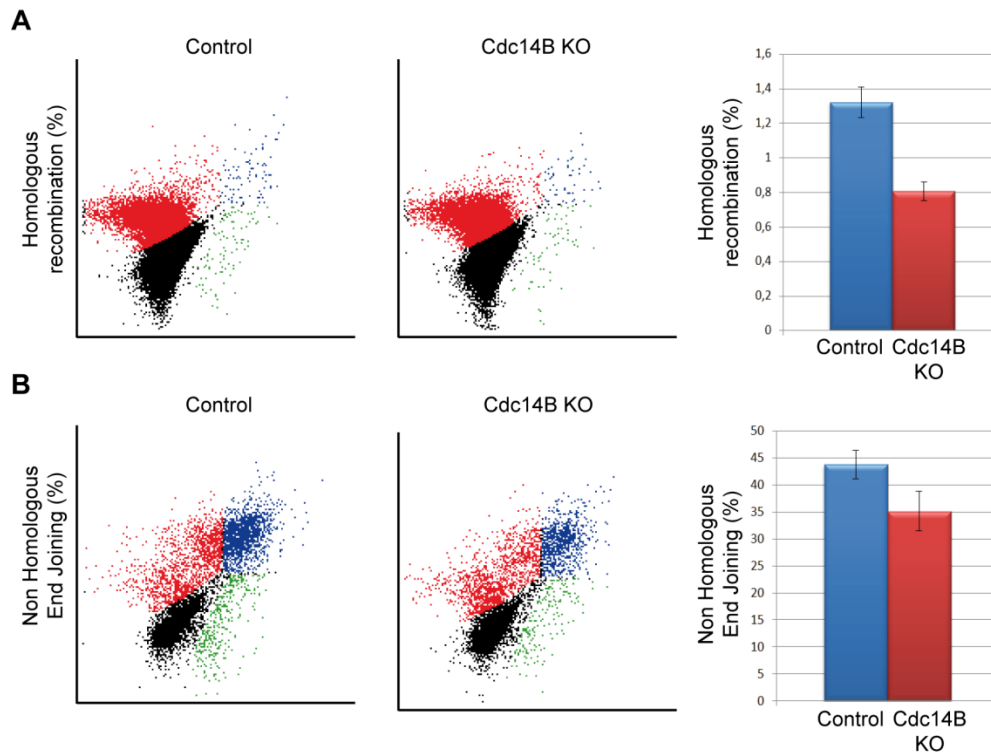


Figura 23. La falta de hCdc14B reduce la eficiencia de reparación. A, B) Células deficientes en hCdc14B (KO) y células control fueron cotransfectadas con los plásmidos portadores del gen GFP específicos para los ensayos de reparación por HR o por NHEJ, previamente linealizados con las enzimas I-SceI y HindIII respectivamente, junto con el plásmido pDsRed como control de transfección. Tras 48 horas se recogieron las células y se analizaron mediante citometría de flujo. Los eventos de transfección marcados en verde muestran las células positivas para GFP, los marcados en rojo corresponden a las células positivas para pDsRed, mientras que los marcados en azul representan las células que son positivas para ambos marcadores. El porcentaje de eficiencia de reparación se obtuvo normalizando las células positivas para GFP frente a las células positivas para DsRed en cada uno de los ensayos. Las gráficas representan la media de 5 valores independientes en el análisis de la eficiencia de reparación por HR y de 3 valores en el caso de la reparación por NHEJ.

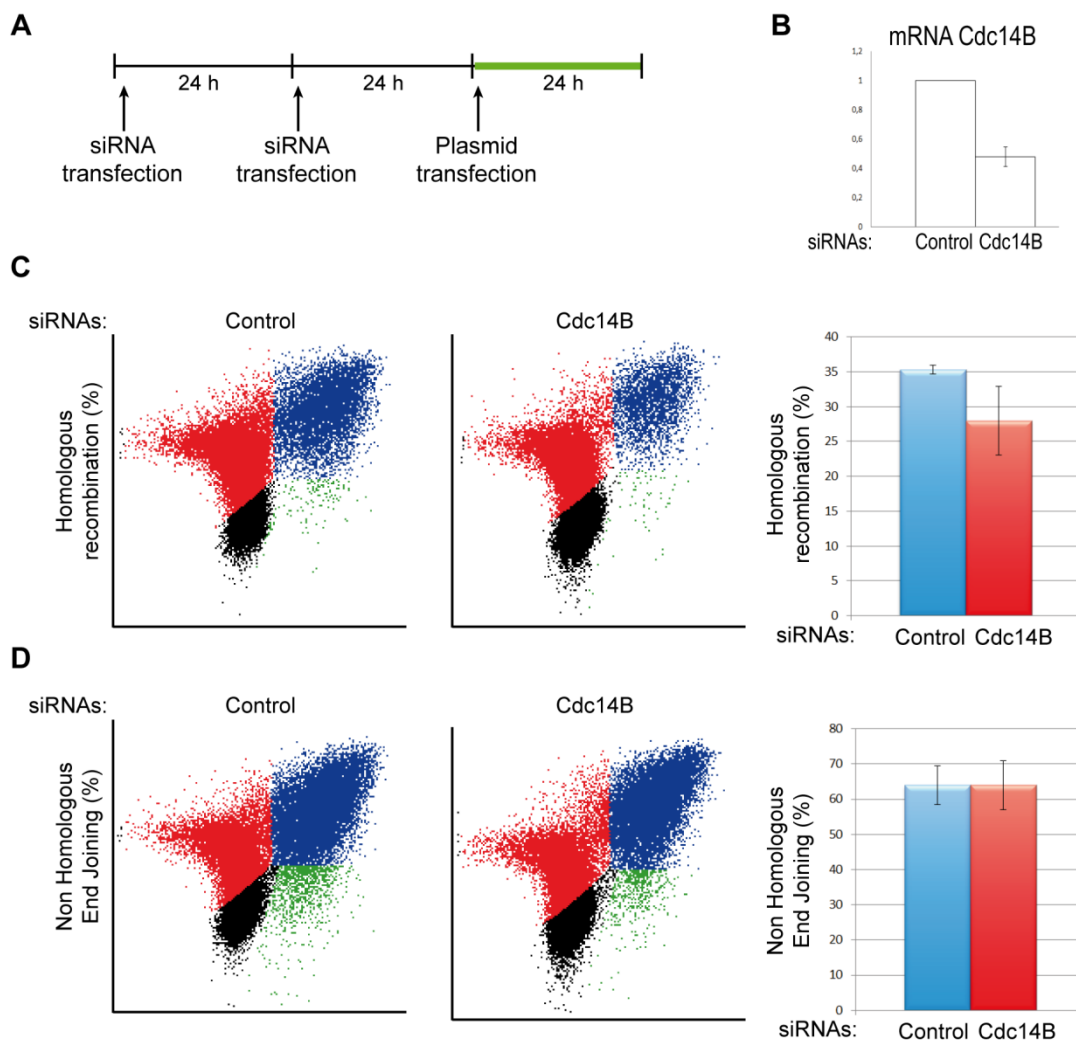


Figura 24. La falta de hCdc14B reduce la eficiencia de reparación. A) Células U2OS se transfectaron con siRNAs frente a hCdc14B o siRNAs control. Tras 48 horas de transfección, las células fueron cotransfectadas con los plásmidos portadores del gen GFP específicos para los ensayos de reparación por HR o por NHEJ, previamente linealizados con las enzimas I-SceI y HindIII respectivamente, junto con el plásmido pDsRed como control de transfección. Tras 48 horas se recogieron las células y se analizaron mediante citometría de flujo. **B)** La eficiencia de depleción se determinó analizando los niveles de mRNA de hCdc14B mediante RT-qPCR. Se consideró valor 1 a la cantidad de mRNA de hCdc14B presente en las muestras control y se refirió a ella la cantidad de mRNA presente en las células tratadas con siRNAs para hCdc14B. **C, D)** Los eventos de transfección marcados en verde muestran las células positivas para GFP, los marcados en rojo corresponden a las células positivas para pDsRed, mientras que los marcados en azul representan las células que son positivas para ambos marcadores. El porcentaje de eficiencia de reparación se obtuvo normalizando las células positivas para GFP frente a las células positivas para DsRed en cada uno de los ensayos. Las gráficas representan la media de 5 valores independientes en el análisis de la eficiencia de reparación por HR y de 3 valores en el caso de la reparación por NHEJ.

En segundo lugar, analizamos la eficiencia de reparación de ambas vías en células que sobreexpresan la fosfatasa. Utilizamos para ello los clones inducibles que expresan hCdc14B o hCdc14B PD. Las células fueron transfectadas con los correspondientes plásmidos linealizados y posteriormente se indujo o no la expresión de la proteína ectópica añadiendo doxiciclina al medio de cultivo. En estas condiciones, no observamos ninguna diferencia en las eficiencias de reparación entre células que sobreexpresan la forma activa de hCdc14B y células control. Estos resultados sugieren que los niveles de proteína endógena parecen ser suficientes para que la maquinaria de reparación actúe con la mayor eficiencia posible en ausencia de daño exógeno, al menos sobre un plásmido externo. En base a estos resultados, nos planteamos analizar la eficiencia de reparación en condiciones de sobreexpresión, tras someter a las células a daño exógeno e inducir por lo tanto la DDR. Para ello, transfectamos las células con los correspondientes plásmidos linealizados y posteriormente indujimos o no la expresión de la proteína ectópica. Para activar la DDR, estas células fueron sometidas a un tratamiento de una hora con peróxido de hidrógeno y posteriormente fueron analizadas tras 12 horas de recuperación (Figura 25A y 26A). Para este tipo de experimentos no pudimos utilizar como agente de daño doxorubicina, ya que se intercala en el DNA y emite fluorescencia enmascarando la propia fluorescencia emitida por los plásmidos utilizados para estos análisis. Como resultado de estos ensayos, comprobamos que las células que sobreexpresan la forma activa de hCdc14B muestran un aumento en el porcentaje de reparación tanto por la vía de HR como por la vía NHEJ respecto a células control (Figura 25C y D). Este efecto no se observa con la sobreexpresión de la forma inactiva (Figura 26C y D).

Todos estos resultados sugieren la participación de hCdc14B en ambas vías de reparación, quizás siendo el efecto más notable sobre la vía de HR. El proceso de recombinación homóloga tiene lugar en la fase S y fase G2, fases caracterizadas por altos niveles de actividad CDK, y es regulado por fosforilación por estos complejos de varias proteínas implicadas en esta ruta. En nuestros experimentos hemos observado que una mayor actividad fosfatasa de hCdc14B aumenta la eficiencia de reparación de esta vía, de forma que resulta plausible hipotetizar que esta fosfatasa tenga una función en el proceso de recombinación homóloga regulando el estado de fosforilación de algunas de las proteínas sustratos de CDK.

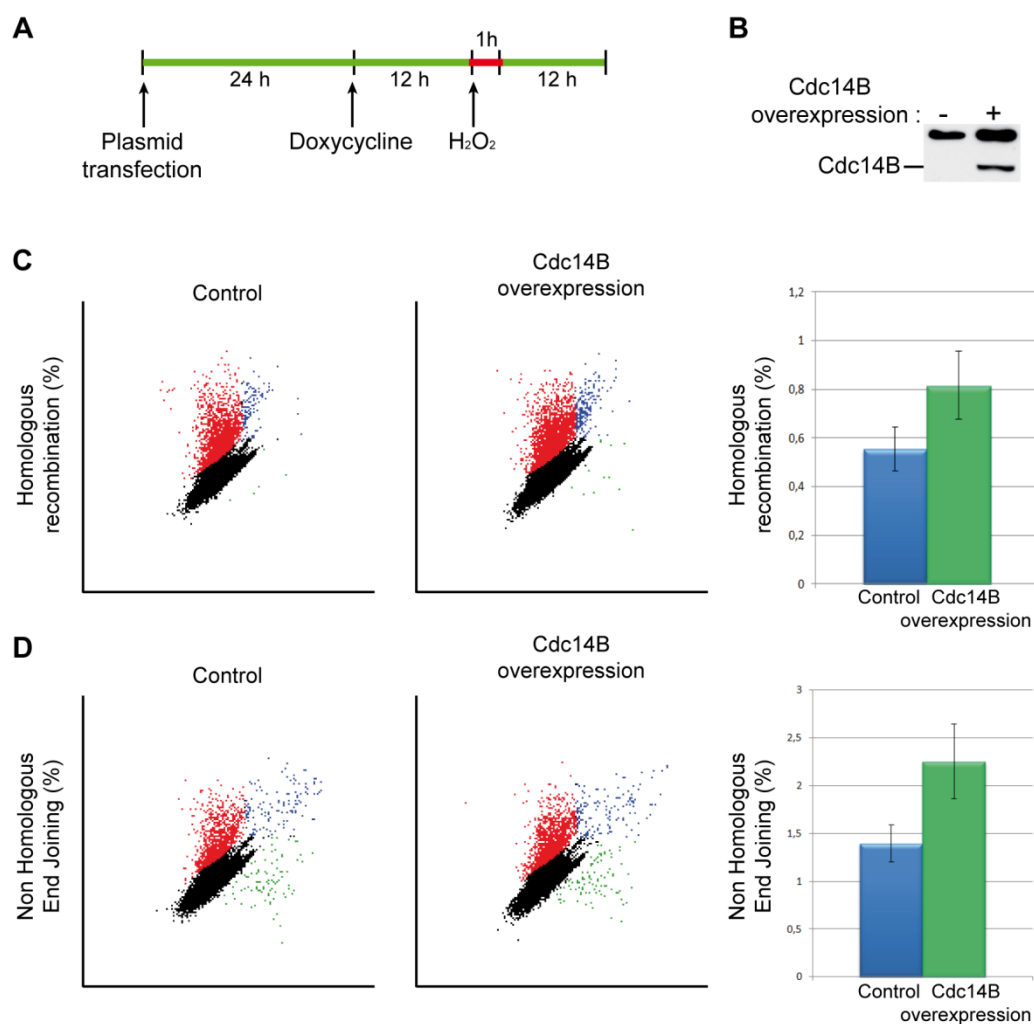


Figura 25. La sobreexpresión de la fosfatasa activa aumenta la eficiencia de reparación. **A, B)** Células HeLa Tet-ON-hCdc14B fueron cotransfectadas con los plásmidos portadores del gen GFP específicos para los ensayos de reparación por HR o por NHEJ, previamente linealizados con las enzimas I-SceI y HindIII respectivamente, junto con el plásmido pDSRed como control de transfección. Tras 24 horas de transfección, se indujo la expresión de hCdc14B mediante la adición de doxyciclina al medio de cultivo. Posteriormente, las células, inducidas y no inducidas, se sometieron a un pulso de una hora con peróxido de hidrógeno (1mM). Finalmente, se recogieron las células y se analizaron mediante citometría de flujo. **C, D)** Los eventos de transfección marcados en verde muestran las células positivas para GFP, los marcados en rojo corresponden a las células positivas para pDsRed, mientras que los marcados en azul representan las células que son positivas para ambos marcadores. El porcentaje de eficiencia de reparación se obtuvo normalizando las células positivas para GFP frente a las células positivas para DsRed en cada uno de los ensayos. Las gráficas representan la media de 5 valores independientes en el análisis de la eficiencia de reparación por HR y de 3 valores en el caso de la reparación por NHEJ.

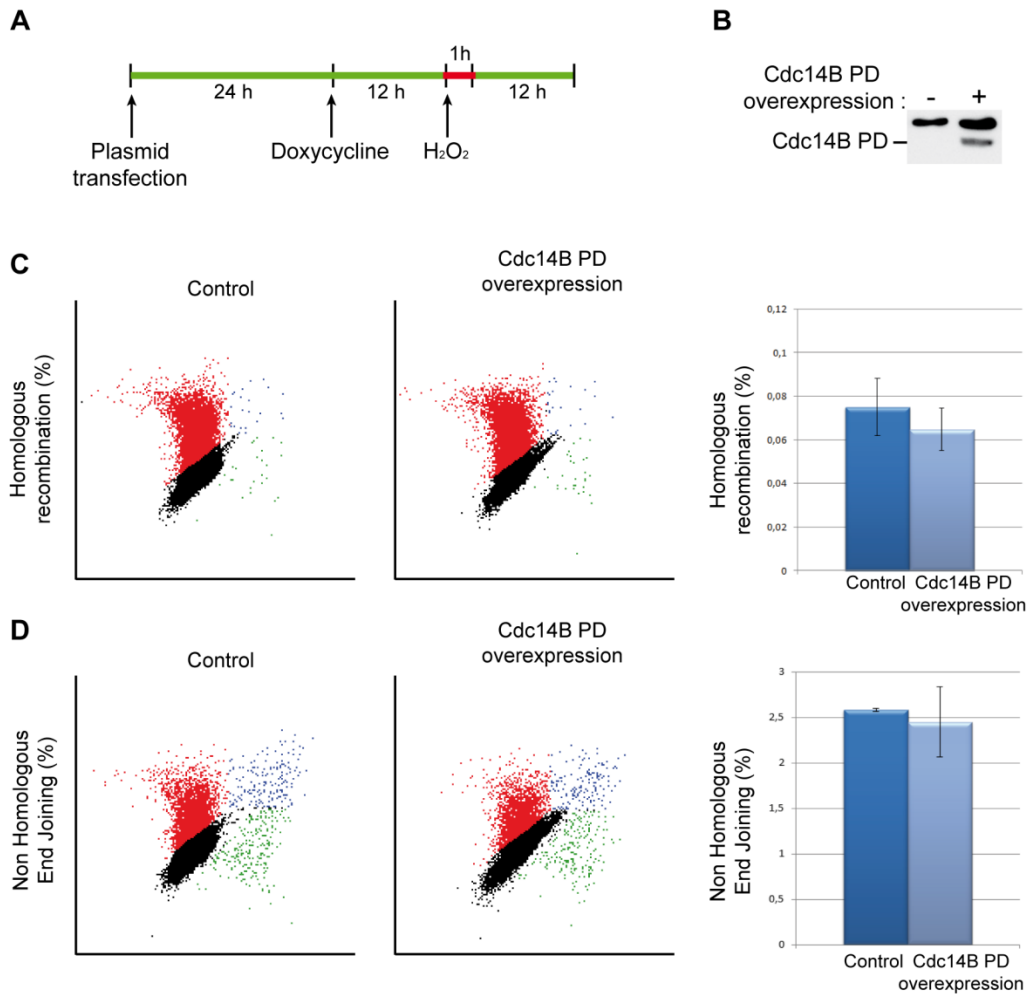


Figura 26. La sobreexpresión de la forma inactiva no afecta a la eficiencia de reparación. **A, B)** Células HeLa Tet-ON-hCdc14B PD fueron cotransfectadas con los plásmidos portadores del gen GFP específicos para los ensayos de reparación por HR o por NHEJ, previamente linealizados con las enzimas I-SceI y HindIII respectivamente, junto con el plásmido pDsRed como control de transfección. Tras 24 horas de transfección, se indujo la expresión de hCdc14B PD mediante la adición de doxiciclina al medio de cultivo. Posteriormente, las células, inducidas y no inducidas, se sometieron a un pulso de una hora con peróxido de hidrógeno (1mM). Finalmente, se recogieron las células y se analizaron mediante citometría de flujo. Los eventos de transfección marcados en verde muestran las células positivas para GFP, los marcados en rojo corresponden a las células positivas para pDsRed, mientras que los marcados en azul representan las células que son positivas para ambos marcadores. El porcentaje de eficiencia de reparación se obtuvo normalizando las células positivas para GFP frente a las células positivas para DsRed en cada uno de los ensayos. **C, D)** Las gráficas representan la media de 5 valores independientes en el análisis de la eficiencia de reparación por HR y de 3 valores en el caso de la reparación por NHEJ.

DISCUSIÓN

I. hCdc14A Y SU POSIBLE IMPLICACIÓN EN PROCESOS MITÓTICOS

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc14 es una proteína esencial a la salida de mitosis. Actúa inactivando los complejos Cdk mitóticos y desfosforilando sustratos de Cdk, de forma que funciona como un regulador clave de eventos mitóticos tardíos, coordinando el control temporal y espacial de la segregación cromosómica junto con el desensamblaje del huso mitótico y la citoquinesis (Queralt and Uhlmann, 2008). El ortólogo en *Schizosaccharomyces pombe*, Flp1/Clp1, no es un gen esencial, pero sí tiene una función a la salida de mitosis contribuyendo a la inhibición de la actividad Cdk en este punto del ciclo y coordinando la división nuclear y la citoquinesis (Cueille et al., 2001; Esteban et al., 2004; Trautmann et al., 2001). Un trabajo reciente ha puesto de manifiesto que en *S. pombe* las fosfatasa de la familia PP1 y PP2A parecen ser las responsables de coordinar los diferentes eventos que tienen lugar a la salida de mitosis (Grallert et al., 2014).

En el caso de células humanas, existen dos isoformas, denominadas hCdc14A y hCdc14B, cuyas funciones están aún poco caracterizadas. Nuestro laboratorio puso de manifiesto que ambas isoformas eran capaces de rescatar los fenotipos originados por la falta de Flp1 en *S. pombe*, indicando que existe homología funcional entre ellos (Vazquez-Novelle et al., 2005). En el caso de la isoforma hCdc14A, se le había relacionado con el ciclo de replicación del centrosoma y como consecuencia de ello, con la segregación cromosómica y posterior citoquinesis (Kaiser et al., 2002; Mailand et al., 2002a). En nuestro grupo, comprobamos que hCdc14A tiene un papel a la entrada en mitosis al inhibir la actividad CDK mitótica mediante la regulación de hCdc25A y hCdc25B, así como de la quinasa Wee1 (Ovejero et al., 2012; Vazquez-Novelle et al., 2010). También, se habían identificado otros sustratos para esta fosfatasa como el coactivador de APC/C, Cdh1 (Bembenek and Yu, 2001), el componente del CPC, INCENP (Gruneberg et al., 2004) y la histona deacetilasa, Sirt2 (Inoue et al., 2007; North and Verdin, 2007b), que la relacionaban con una posible función en salida de mitosis. Basándonos en estos datos y dado nuestro interés en identificar las fosfatasa responsables de la regulación de la salida de mitosis revirtiendo las fosforilaciones mediadas por los complejos CDK mitóticos, nos planteamos la posibilidad de que hCdc14A fuera una de ellas.

Nuestros resultados muestran que la falta de hCdc14A no impide o retrasa la cinética de salida de mitosis, indicando que esta fosfatasa no es esencial en este punto del ciclo. De igual modo, no parece que hCdc14A sea la responsable de desfosforilar a hCdc25A y Wee1 para inducir su degradación y estabilización, respectivamente, en esta fase del ciclo. Sin embargo, ante nuestros resultados consideramos que una posible explicación a la falta de efecto ante la carencia de esta fosfatasa sería la existencia de redundancia funcional entre ambas isoformas de hCdc14, de modo que la ausencia de fenotipos obvios a la salida de mitosis en células carentes de hCdc14A podría deberse a que la isoforma hCdc14B presente funciones solapantes que compensen la falta de la otra isoforma. Sin embargo, nuestros experimentos con depleción tanto de hCdc14A como hCdc14B mediante siRNAs muestran que

la falta de ambas no impide la salida de mitosis sugiriendo que no son esenciales en este punto del ciclo. Dado que es difícil detectar ambas proteínas endógenas con los anticuerpos disponibles, cabía también la posibilidad de que aunque los niveles de mRNA de ambas isoformas fueran muy bajos tras el tratamiento con los siRNAs, existiesen niveles de proteína suficientes que permitiesen llevar a cabo su función. Pero de nuevo, células KO para hCdc14A o hCdc14B, tampoco muestran defectos en salida de mitosis. Para confirmar que, a diferencia de lo que ocurre en *Saccharomyces cerevisiae*, estas fosfatasas no son esenciales en este punto del ciclo, sería necesario analizar la salida de mitosis en células KO para ambas isoformas.

Otra posibilidad, bastante aceptada actualmente, es que en el caso de metazoa, la inactivación de los complejos CDK y la desfosforilación de sus sustratos a la salida de mitosis la lleven a cabo otras fosfatasas. Aunque no se conocen con precisión cuales son estas fosfatasas, diferentes trabajos han adjudicado funciones importantes en este punto del ciclo a fosfatasas de la superfamilia PPP, en concreto a PP2A y a PP1, como ocurre en *Schizosaccharomyces pombe*. Respecto a la posible función de PP1 a la salida de mitosis existe controversia. En el organismo *Xenopus laevis*, se ha asignado a PP1 una función importante a la salida de mitosis en base al retraso en la desfosforilación de varios sustratos de CDK que se observa tras inmunodepleción de la fosfatasa (Wu et al., 2009). Sin embargo, otros grupos solo han observado un retraso muy ligero en la desfosforilación de sustratos de CDK tras inmunodepleción de PP1 o adición de inhibidores específicos (Castilho et al., 2009; Mochida et al., 2009). Tampoco se han identificado subunidades catalíticas ni reguladoras de los complejos PP1 en los *screenings* realizados, basados en el uso de siRNAs, para identificar proteínas implicadas en salida de mitosis en células humanas (Schmitz et al., 2010). Sin embargo, estos estudios no descartan una posible contribución de PP1 a la salida de mitosis, ya que hay que tener en cuenta las limitaciones técnicas inherentes a los estudios de inmunodepleción y uso de RNAs de interferencia. La otra fosfatasa es PP2A, que junto con las subunidades reguladoras de la subfamilia B55 (B55 α en células humanas, B55 δ en *Xenopus laevis* y ambas subunidades en fibroblastos de ratón), ha sido descrita como la principal fosfatasa que promueve la salida de mitosis mediante la desfosforilación directa de los sustratos de CDK (Manchado et al., 2010; Schmitz et al., 2010). La depleción de las subunidades reguladoras de la subfamilia B55 mediante RNAs de interferencia, aunque retrasa la salida de mitosis de forma significativa, no la impide completamente. Los autores del trabajo sugieren que esta fosfatasa es la principal responsable de desfosforilar los sustratos de CDK a la salida de mitosis y atribuyen el hecho de que su falta no impida completamente la salida de mitosis, a que los siRNAs utilizados no sean completamente eficientes. Por otro lado, trabajos recientes también han otorgado una función importante a la fosfatasa Fcp1 a la salida de mitosis desfosforilando los sustratos Cdc20 y USP44, cuya desfosforilación es necesaria para inactivar el SAC y permitir el comienzo de anafase, y desfosforilando también a Wee1 para permitir la inactivación de los complejos CDK1-ciclina B1 (Visconti et al., 2012).

Por todo ello, parece evidente que la inactivación de los complejos CDK y la desfosforilación de sus sustratos a la salida de mitosis, a diferencia de lo que ocurre en *Saccharomyces cerevisiae* donde Cdc14 es la principal fosfatasa responsable, es llevada a cabo por varias fosfatasas que probablemente tengan funciones solapantes, pero entre las cuales las hCdc14 no parecen tener un papel destacado.

Aunque la falta de hCdc14A no impide la salida de mitosis, sí hemos observado que la acelera ligeramente con respecto a la de células control, lo que sugiere un posible papel en el *checkpoint* del ensamblaje del huso mitótico (SAC). El SAC se activa desde el inicio de mitosis, debido a la presencia de cinetocoros no unidos a microtúbulos o unidos de forma incorrecta. Al inicio de mitosis, diversas proteínas entre las que se incluyen proteínas de los complejos HEC1 y MIS12 junto con la proteína KNL1, son reclutadas hacia el cinetocoro externo y actúan regulando la unión de los cinetocoros a los microtúbulos y sirviendo de plataforma para reclutar las proteínas del SAC (MAD1, MAD2, BUB1, BUB3, BUBR1 y MPS1) (Cheeseman et al., 2006). Las proteínas del SAC inhiben la unión de Cdc20 al complejo APC/C impidiendo su activación y, consecuentemente, impidiendo la poliubiquitinación y posterior degradación de ciclina B1 y securina, inhibiendo así el inicio de anafase. Por tanto, manteniendo secuestrado a Cdc20, el SAC previene estos eventos y prolonga la prometafase hasta que todos los cinetocoros están unidos de forma correcta a los microtúbulos. Cuando esto ocurre, se induce la inactivación del SAC y con ello la segregación cromosómica y la progresión por las etapas finales de la mitosis (Chung and Chen, 2003; D'Angiolella et al., 2003; Musacchio and Salmon, 2007; Tang et al., 2004). Si hCdc14A está implicada en el SAC, cabría esperar que las células carentes de esta proteína, aun sin llegar a conseguir unas uniones cinetocoro-microtúbulos correctas, no detengan eficientemente la anafase e inicien la segregación de forma prematura, con respecto a células control, tal y como muestran nuestros datos.

Hemos observado que la sobreexpresión de hCdc14A previene que las células escapen ante un arresto mitótico prolongado, inducido por ejemplo por tratamiento con nocodazol, como sucede en células control o en células que sobreexpresan la forma inactiva de la fosfatasa (datos no mostrados), lo que sugiere que hCdc14A participa en el mantenimiento del SAC. Sin embargo, no hemos observado diferencias significativas entre células control y células deficientes en hCdc14A en el porcentaje de células que activan el SAC y se bloquean en prometafase en respuesta a tratamientos como nocodazol. Luego concluimos que la participación de hCdc14A no parece ser muy destacada. Cabe la posibilidad de que ante la falta de hCdc14A, hCdc14B participe en esta función de modo que la falta de una fuese compensada por la otra. Por ello, sería conveniente analizar el funcionamiento del SAC en células KO para ambas fosfatasas en respuesta a drogas que producen un arresto en mitosis. Estos análisis se están llevando a cabo actualmente en nuestro laboratorio.

Dado que la función del SAC consiste en detener la anafase, dando tiempo a que todos los cinetocoros se unan de forma correcta a los microtúbulos, una menor funcionalidad de este punto de control, quizás producida por la falta de hCdc14A, puede llevar a anomalías en el

proceso de repartición del material genético. Nuestros resultados muestran que en cultivos deficientes en hCdc14A un porcentaje de células, aunque no muy elevado sí superior al de cultivos de células control, presentan defectos en segregación cromosómica, caracterizados por segregaciones desiguales o incompletas, en ocasiones acompañadas por husos mitóticos también anómalos, de forma que estas anomalías podrían venir explicadas por la posible función de hCdc14A en el mantenimiento de este *checkpoint*.

Además de los componentes del SAC existen diversas proteínas que actúan regulando su función. Entre ellas se encuentra la quinasa Aurora B, que junto con tres subunidades no enzimáticas (INCENP, Survivin y Borealin) forma el complejo CPC (Vader et al., 2006). Este complejo fue implicado inicialmente en el SAC en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en la cual se observó que Ipl1 (ortólogo de Aurora B) era necesaria para este *checkpoint*, con una función en el desensamblaje de cinetocoros no unidos correctamente a microtúbulos que posteriormente serían reconocidos por el SAC (Pinsky et al., 2006). Las funciones llevadas a cabo por este complejo están reguladas por cambios en su localización. Inicialmente el CPC se detecta a lo largo de los brazos de los cromosomas, pero progresivamente se va concentrando en los centrómeros durante prometafase y metafase (Monier et al., 2007). Esta localización del complejo en mitosis temprana es necesaria para llevar a cabo diferentes funciones como el mantenimiento de la estructura de los cromosomas mitóticos, la regulación del ensamblaje del huso, la regulación de la formación de la estructura trilaminar del cinetocoro y de las correctas uniones cinetocoro-microtúbulo, la adecuada orientación bipolar de los cromosomas y el reclutamiento de las proteínas componentes del SAC hacia el cinetocoro (Hua et al., 2011; Ruchaud et al., 2007; Saurin et al., 2011; Tanno et al., 2010; Vazquez-Novelle and Petronczki, 2010; Welburn et al., 2010). Posteriormente, el CPC se transfiere hacia la zona media del huso en anafase y telofase y al cuerpo medio en citoquinesis. En este punto, el complejo lleva a cabo diferentes funciones como la formación y la estabilización de la zona media del huso, la regulación de la formación y función del anillo contráctil y la regulación del proceso de abscisión (Carlton et al., 2012; Douglas et al., 2010a; Su et al., 2011).

Ortólogos de Cdc14 en diferentes organismos han sido implicados en la regulación de la localización del complejo CPC. En *Schizosaccharomyces pombe*, Flp1 parece regular la correcta orientación bipolar de las cromátidas hermanas a través de la regulación de la localización de Aurora B en los centrómeros en prometafase, quizás mediante desfosforilación de alguno de los otros componentes del CPC (Trautmann et al., 2004). En *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc14 desfosforila al ortólogo de INCENP siendo esta desfosforilación necesaria para la transferencia del CPC hacia la zona media del huso en anafase (Pereira and Schiebel, 2003). Igualmente, en células humanas, el reclutamiento de este complejo hacia la zona central del huso ocurre en anafase, cuando se revierten las fosforilaciones inhibitoras mediadas por CDK1 sobre INCENP (Hummer and Mayer, 2009), siendo hCdc14A capaz de desfosforilarlo *in vitro* (Gruneberg et al., 2004). Además, hCdc14A presenta una localización similar al complejo CPC en las diferentes etapas de la mitosis, localizándose de forma difusa por la célula pero también concentrándose en los centrómeros, tras su interacción con PLK1 en las etapas

iniciales (Yuan et al., 2007). A la salida de mitosis, se localiza en los polos del huso mitótico y en la zona central del mismo colocándose con PLK1, el complejo INCENP-Aurora B y MKLP2 (Gruneberg et al., 2004). En nuestros experimentos no observamos alteraciones en la localización de Aurora B en prometáfase ni metafase en células carentes de hCdc14A, pero sí observamos alteraciones en la localización de esta quinasa en anafase en un cierto porcentaje de células deficientes en la fosfatasa, lo que sugiere que hCdc14A podría regular la localización de Aurora B en anafase, quizás mediante desfosforilación de INCENP. Para confirmar esta hipótesis, sería necesario corroborar la desfosforilación de INCENP por esta fosfatasa *in vivo* determinando si esta desfosforilación se produce sobre el residuo Thr⁵⁹, residuo fosforilado por complejos CDK (Goto et al., 2006) y cuya desfosforilación es necesaria para el reclutamiento de INCENP e interacción con MKLP2 en la zona media del huso (Hummer and Mayer, 2009).

Las anomalías que observamos en segregación cromosómica en células deplecionadas para hCdc14A podrían deberse a la acción de esta fosfatasa sobre la localización de Aurora B, de modo que alteraciones en la localización de esta proteína dieran lugar a anomalías en segregación. Aunque no hemos observado defectos en la localización centromérica de Aurora B al inicio de mitosis en células deplecionadas para hCdc14A, sí hemos observado deslocalización de la proteína, en un determinado número de células en anafase, en las cuales Aurora B no se ha desplazado a la zona media del huso mitótico y permanece localizada en los cromosomas. La retención centromérica de Aurora B en este punto del ciclo unido a la pérdida de tensión entre los centrómeros y los cinetocoros ante la separación de las cromátidas hermanas podría ser la responsable de desestabilizar las uniones cinetocoro-microtúbulo por desfosforilación de sustratos de Aurora B localizados en los cinetocoros. Esta desestabilización en las uniones podría generar deficiencias en el proceso de segregación explicando los fenotipos que observamos en nuestras células. Sin embargo, se ha descrito que la retención centromérica de Aurora B en anafase no parece desestabilizar las uniones cinetocoro-microtúbulo (Vazquez-Novelle and Petronczki, 2010; Wurzenberger et al., 2012).

La localización de Aurora B en la zona media del huso durante anafase y telofase y en el cuerpo medio durante citoquinesis es importante para la regulación de la estabilización de la zona media y la posterior citoquinesis, de modo que la retención centromérica de Aurora B en anafase produce graves defectos en citoquinesis (Hummer and Mayer, 2009). Estos datos sugieren que los defectos que hemos observado en citoquinesis en nuestro laboratorio en un porcentaje de células deplecionadas para hCdc14A, así como los descritos también en varios trabajos (Kaiser et al., 2002; Mailand et al., 2002a), podrían deberse a alteraciones en la localización del complejo CPC.

Los defectos en segregación cromosómica observados en células deficientes en hCdc14A, también podrían deberse a su acción sobre otras proteínas mitóticas. hCdc14A podría regular el estado de fosforilación de alguna de las proteínas componentes del SAC,

varias de ellas fosforiladas por CDK, impidiendo que este *checkpoint* funcionase correctamente.

Con el fin de identificar sustratos de hCdc14A que permitiesen explicar los defectos en segregación cromosómica y citoquinesis, realizamos un análisis proteico, basado en la identificación de proteínas cuyo grado de fosforilación por CDK a la salida de mitosis, fuese mayor en células carentes de la fosfatasa que en células control. Como resultado de estos análisis identificamos seis proteínas, posibles sustratos de hCdc14A. Dos de ellas (PAK2 y FNIP1) participan en vías de señalización que regulan diferentes procesos como motilidad celular, transcripción de genes, proliferación celular, apoptosis, progresión por el ciclo celular, niveles de nutrientes en la célula,..etc. Otras de las proteínas identificadas presentan funciones más específicas como PUS3, que participa en la síntesis de tRNA; GIMAP5, que participa en el mantenimiento de la integridad de la mitocondria y SerpinB7, que inhibe enzimas proteasas. De entre todas ellas, nos centramos en CDCA2 la cual se ha descrito que tiene funciones a la salida de mitosis participando en la remodelación de la cromatina y en el reensamblaje de la envuelta nuclear, lo que la hace un potencial sustrato mediador del efecto observado en segregación. Además, aunque se ha demostrado que la mayoría de estas proteínas son fosforiladas en mitosis y son potenciales sustratos de CDK (Dephoure et al., 2008), solo CDCA2 ha sido confirmada como sustrato de los complejos CDK mitóticos (Vagnarelli et al., 2006; Vagnarelli et al., 2011).

CDCA2, también denominada RepoMan (Trinkle-Mulcahy et al., 2006), actúa como subunidad reguladora de fosfatasas PPP como PP1 y PP2A, siendo también capaz de interactuar con quinasas como DNA-PK y ATM y con proteínas como las importinas (Prevost et al., 2013). RepoMan se localiza en el nucleoplasma durante interfase, pasando a mostrar una localización difusa en las etapas iniciales de la mitosis para finalmente acumularse en cromatina en las etapas finales de la misma (Trinkle-Mulcahy et al., 2006). Tanto sus funciones como su localización están reguladas por procesos de fosforilación/desfosforilación, siendo fosforilada al inicio de mitosis por los complejos CDK1-ciclina B1 y Aurora B, y posteriormente desfosforilada, al inicio de anafase, para permitir su unión con PP1 γ y la localización de estos complejos en cromatina (Vagnarelli et al., 2006; Vagnarelli et al., 2011). Los complejos PP1 γ -RepoMan actúan revirtiendo las fosforilaciones en los residuos H3S10 y H2S28 de las histonas, implicados en la regulación de la arquitectura de los cromosomas, así como desfosforilando el residuo H3T3, cuya desfosforilación elimina el sitio de unión para el CPC, promoviendo la transferencia del complejo desde los centrómeros a la zona central del huso (Qian et al., 2011; Vagnarelli et al., 2011). Células deplecionadas para hCdc14A presentan esta localización del CPC, concretamente de Aurora B, alterada, manteniéndose unida esta quinasa, en parte, a los cromosomas en anafase. Por tanto, en base a todos estos datos, pensamos en la posibilidad de que hCdc14A estuviera implicada en la desfosforilación de RepoMan a la salida de mitosis, de forma que la falta de la misma impediría la formación de los complejos PP1 γ -RepoMan afectando a la relocalización del CPC en la zona media del huso mitótico en anafase lo que

podría alterar la función de Aurora B, o alterando la estructura de los cromosomas y como consecuencia su segregación.

Comprobamos que en condiciones de sobreexpresión ambas formas de hCdc14 interactúan y desfosforilan a RepoMan. Sin embargo, nuestros datos indican que no son estas fosfatasa las responsables de su desfosforilación a la salida de mitosis. La sobreexpresión o depleción de hCdc14A y/o hCdc14B no afecta a la cinética de desfosforilación de RepoMan en este punto del ciclo. Por tanto, los defectos en segregación cromosómica así como la deslocalización de Aurora B, observados en células deficientes en hCdc14A, no parecen estar mediados por alteraciones en la desfosforilación y, posible función, de esta proteína.

Quisimos determinar la proteína responsable de desfosforilar a RepoMan centrándonos en la superfamilia PPP, en base a la gran variedad de trabajos que implican a PP2A y a PP1 en la desfosforilación de los sustratos de los complejos CDK a la salida de mitosis, recientemente también confirmado en *S. pombe* (Grallert et al., 2014; Manchado et al., 2010; Mochida et al., 2009; Schmitz et al., 2010; Wu et al., 2009). Nuestros resultados indican que las fosfatasa tipo *PP2A-like* (PP2A, PP4, PP5, PP3 y/o PP1) son responsables, en parte, de la desfosforilación de RepoMan a la salida de mitosis y sugieren la existencia además de otras fosfatasa implicadas en su desfosforilación en esta fase del ciclo. La otra posibilidad que nos planteamos es que hCdc14A, o incluso hCdc14B, estuvieran reguladas por RepoMan, ya que actúa como reguladora de diversas proteínas incluyendo fosfatasa de la superfamilia PPP. Hemos observado interacción entre RepoMan y ambas isoformas de hCdc14, y en colaboración con el grupo de Mathieu Bollen (*Universidad de Leuven (Bélgica)*) sabemos que la interacción depende de actividad CDK y se limita a la región C-terminal (aminoácidos 600-1023) de RepoMan. Estos datos apuntan a una relación entre ellas, la cual precisa de análisis adicionales para ser corroborada y posteriormente poder conocer su significado biológico. En base a la función descrita para RepoMan, regulando la localización de diferentes proteínas, resulta interesante determinar en qué momento preciso del ciclo celular se produce la interacción con las fosfatasa hCdc14, y en el caso de hCdc14B, si es RepoMan quien la recluta hacia la cromatina anafásica, de igual modo que ocurre con otras proteínas.

Los datos previos así como los resultados mostrados en esta tesis indican que en células humanas, a diferencia de lo que ocurre en *Saccharomyces cerevisiae* donde Cdc14 es una fosfatasa esencial para la salida de mitosis, hCdc14A no es esencial en este punto del ciclo. La función de las Cdc14 en mitosis no está conservada en otros organismos eucariotas como *Schizosaccharomyces pombe* y metazoa, en los cuales las fosfatasa de la familia PP1 y PP2A, junto con Fcp1 en células de mamífero, parecen ser las responsables de coordinar los diferentes eventos que tienen lugar a la salida de mitosis.

II. PARTICIPACIÓN DE hCdc14B EN LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL DNA

Las células durante su proceso de crecimiento y división están continuamente sometidas a agresiones externas e internas que pueden afectar a su material genético dañándolo de diferentes maneras. Uno de los tipos de daño más peligroso para las células son las roturas en la doble cadena del DNA, las cuales pueden conducir a pérdidas del material genético. Para mantener la integridad del genoma, las células necesitan responder adecuadamente a los diferentes tipos de daño que se producen en el DNA, mediante activación de las vías de señalización que se conocen como "Respuesta a Daño en el DNA" (DDR). Esta respuesta implica la activación del *checkpoint* de daño, cuya finalidad es parar la progresión por el ciclo celular, y la activación de mecanismos de reparación del daño generado. En la DDR participan numerosas quinasas encargadas de detectar el sitio donde se ha producido la lesión, reclutar diferentes proteínas implicadas en la vía y, desencadenar la parada del ciclo y reparación del daño generado, o en otros casos, conducir a senescencia o apoptosis, mediante la fosforilación de diversos sustratos (Geuting et al., 2013; Medema and Macurek, 2012; Zou and Elledge, 2003).

Diferentes fosfatasa como PP1, PP2A, PP4, PP5, PP6 y Wip1 han sido implicadas en la inactivación de la DDR. Una vez que se produce la reparación del daño generado, las fosforilaciones mediadas por las quinasas participantes en la DDR, son revertidas por estas fosfatasas, permitiendo la recuperación de las células y su reentrada en el ciclo celular. Sin embargo, el trabajo de los últimos años ha puesto de manifiesto que la actividad fosfatasa tiene también una función muy importante en la activación de esta respuesta, siendo las fosfatasas participantes activos tanto en el *checkpoint* de daño al DNA como en los propios mecanismos de reparación. Además, las fosfatasas también están implicadas en mantener a diversas proteínas que participan en la DDR en un estado inactivo durante el crecimiento normal de las células (Freeman and Monteiro, 2010; Lee and Chowdhury, 2011; Shimada and Nakanishi, 2013).

La regulación espacial y temporal de los eventos de fosforilación/desfosforilación es esencial para la correcta funcionalidad de la DDR y está determinada por un complejo balance de actividades quinasa y fosfatasa. Sin embargo, aunque el papel de las quinasas en la respuesta a daño en el DNA está bastante bien caracterizado, el papel de las fosfatasas está comenzando a ser investigado. Resulta, por tanto, de especial importancia conocer la función y regulación de la actividad de las fosfatasas para llegar a entender los mecanismos moleculares implicados en la DDR.

Trabajo previo realizado en nuestro grupo, había puesto de manifiesto que en *Schizosaccharomyces pombe* Cdc14/Flp1 está implicada en la activación del *checkpoint* frente a estrés replicativo. En estas condiciones, Flp1 sale del nucléolo hacia el núcleo por un mecanismo dependiente de fosforilación por Cds1, para participar de forma directa en la

activación del *checkpoint* (Diaz-Cuervo and Bueno, 2008). El trabajo desarrollado por el grupo de Kathleen Gould corroboró que ante estrés replicativo así como ante otros tipos de estrés genotóxico, las quinasas de *checkpoint* Cds1, Chk1 y otras quinasas como Pmk1 y Cdk1 fosforilan a Flp1 favoreciendo su traslocación desde el nucléolo hacia el núcleo (Broadus and Gould, 2012).

A la fosfatasa hCdc14B se le ha otorgado un papel en la activación del *checkpoint* de daño al DNA. Tras roturas de doble cadena en el DNA durante la fase G2, hCdc14B se relocaliza desde el nucléolo hacia el nucleoplasma, previa probable fosforilación por Chk1, promoviendo la desfosforilación de Cdh1 y la activación del complejo APC/C^{Cdh1}, que lleva a la degradación de PLK1. La degradación de PLK1 induce estabilización de Claspin, proteína necesaria para la activación de la quinasa de *checkpoint* Chk1, y de Wee1, quinasa inhibidora de la actividad CDK (Bassermann et al., 2008; Peddibhotla et al., 2011). Respecto a esta posible función existe controversia ya que estos resultados, obtenidos en células humanas deplecionadas para hCdc14B mediante siRNAs, no se corroboran en otros tipos de líneas celulares KO para la fosfatasa, en las cuales se observa un *checkpoint* de daño al DNA en G2 funcional, capaz de sensar y arrestar las células antes de la entrada en mitosis (Mocciaro et al., 2010). Sin embargo, estas células presentan deficiencias en las cinéticas de reparación de roturas de doble cadena en el DNA inducidas por agentes genotóxicos, y tienen mayor número de focos de daño que las células control, incluso en condiciones basales o de ausencia de daño exógeno, indicando deficiencias en el proceso de reparación y otorgando un posible papel para hCdc14B en este proceso (Mocciaro et al., 2010).

Nuestro trabajo corrobora que, tras daño en el DNA ocasionado por agentes genotóxicos que producen roturas de doble cadena del DNA, hCdc14B sale desde el nucléolo hacia el nucleoplasma, indicando una posible participación de la proteína en la respuesta a daño en el DNA frente a este tipo de lesiones. No hemos observado, sin embargo, un cambio en la localización de hCdc14B frente a otros tipos de estrés como estrés osmótico o replicativo. Nuestros experimentos, llevados a cabo en células deficientes en hCdc14B muestran que estas células presentan menores niveles de fosforilación y por lo tanto menor activación de Chk1, así como también menor acumulación de Wee1 que células control, tras daño en el DNA. Sin embargo, esta observación no tiene como consecuencia una parada menos eficiente del ciclo en G2 con respecto a células control. Esto puede deberse a que ante la falta de la fosfatasa, aunque existe menor activación de Chk1, se hayan desarrollado mecanismos compensatorios que permitan la eficiente parada del ciclo ante la presencia de daño en el DNA. Pero en definitiva, la falta de hCdc14B aunque causa una menor activación de la quinasa de *checkpoint* Chk1, no afecta a la capacidad de la célula de ralentizar la progresión por el ciclo como mecanismo de control frente al daño. Sin embargo, hemos comprobado que las células que sobreexpresan la forma activa de hCdc14B presentan mayor eficiencia en la activación del *checkpoint* de daño al DNA, como se refleja en una parada más eficiente del ciclo en G2. Este efecto no se observa en las células que sobreexpresan la forma inactiva (hCdc14B PD) lo que

indica que está mediado por su actividad fosfatasa. Los niveles de sobreexpresión de hCdc14B en nuestras células no afectan a la progresión por un ciclo celular normal, lo que sugiere que la parada del ciclo observada tras daño en el DNA en células que sobreexpresan la fosfatasa es consecuencia directa de la función de hCdc14B en la activación del *checkpoint* de daño al DNA. Por otro lado, la sobreexpresión de la isoforma hCdc14A, que previamente se ha corroborado que actúa inhibiendo la actividad CDK a la entrada en mitosis (Vazquez-Novelle et al., 2010), no conduce, sin embargo, a una mayor activación del *checkpoint* lo que apunta a una posible función específica de hCdc14B.

El posible mecanismo a través del cual hCdc14B podría participar en la activación del *checkpoint* tras daño podría ser el descrito en el artículo Bassermann et al., 2008, en el cual esta fosfatasa una vez en el nucleoplasma, promueve la activación del complejo APC/C^{Cdh1} y la consecuente degradación de proteínas inductoras de la entrada en mitosis y estabilización de reguladores del *checkpoint*, como ya hemos mencionado. Otra posibilidad, no excluyente, es que hCdc14B esté regulando a Wee1 no solo de manera indirecta a través de Cdh1 sino también por desfosforilación directa para estabilizarla en respuesta a daño en el DNA. Datos de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que Wee1 es un sustrato de hCdc14B. hCdc14B desfosforila a Wee1 en residuos modificados por los complejos CDK e implicados en su estabilidad (Ovejero et al., 2012). Sin embargo, alteraciones en los niveles de hCdc14B no parecen afectar a la estabilidad de Wee1 durante un ciclo normal, por lo que cabe la posibilidad de que hCdc14B regule a Wee1 en determinadas condiciones celulares como ante roturas de doble cadena en el DNA. Esta hipótesis debe ser corroborada.

La desregulación de los niveles de hCdc14B también afecta al proceso de reparación. Tras tratamiento con agentes genotóxicos, las células carentes de hCdc14B presentan mayores niveles de daño y también durante más tiempo que células control. Por el contrario, en células que sobreexpresan la forma activa de hCdc14B, pero no su forma inactiva, se observa el efecto contrario. Se ha descrito que una mayor extensión de la fase G2 tiene como consecuencia una reparación más eficiente del daño generado (Dekanty et al., 2014). También se ha observado que una mayor actividad CDK1, producida por inhibición de Wee1, dificulta el proceso de reparación por recombinación homóloga no solo por acortamiento de la fase G2, sino también por la fosforilación de BRCA2, lo que impide la unión de esta proteína con los polímeros de RAD51 y su carga en el DNA para la reparación del daño (Krajewska et al., 2013). En base a estos datos, la mayor eficiencia de reparación observada en células que sobreexpresan hCdc14B podría deberse no solo a una mayor eficiencia en la parada del ciclo, sino también a una función de hCdc14B contrarrestando las fosforilaciones inhibitoras mediadas por CDK1 sobre algún componente de la vía de reparación como BRCA2.

Como resultado de nuestros análisis para estudiar la posible función de hCdc14B en alguna de las dos vías de reparación de roturas de doble cadena, como son la recombinación homóloga (HR) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ), observamos que las células carentes de hCdc14B muestran una reducción significativa en la eficiencia de reparación por la

vía de HR, siendo este efecto menos destacado en la vía NHEJ. La sobreexpresión de la forma activa de la fosfatasa, sin embargo, no aumenta la eficiencia de reparación de ninguna de las dos vías respecto a células control en condiciones basales, sugiriendo que los niveles de proteína endógena parecen ser suficientes para que la maquinaria de reparación actúe con la mayor eficiencia posible en ausencia de daño exógeno, al menos sobre DNA no cromosómico como es el sistema en el que se basan nuestros ensayos. Sin embargo, la sobreexpresión de hCdc14B en células sometidas a estrés genotóxico, sí aumenta la eficiencia de reparación por ambas vías, efecto que no se observa con sobreexpresión de la forma inactiva de la fosfatasa. Estos resultados sugieren que hCdc14B participa, probablemente de forma directa, en la reparación del DNA vía HR y quizás también en los mecanismos de reparación por la vía de NHEJ. Para corroborar esta posibilidad sería decisivo identificar el mecanismo molecular a través del cual hCdc14B actúa en una o ambas vías de reparación. Como se ha descrito en la introducción, muchas de las proteínas participantes en la reparación, fundamentalmente por recombinación homóloga, son reguladas por fosforilación por los complejos CDK. La elección del tipo de reparación depende de la fase del ciclo en la que se encuentre la célula y por tanto de la actividad CDK (Ira et al., 2004). Puesto que las fosfatasas de la familia hCdc14 desfosforilan preferentemente residuos fosforilados por los complejos CDK (Bremmer et al., 2012), es posible que hCdc14B participe en esta vía regulando el estado de fosforilación de alguna de las proteínas participantes.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha implicado a la fosfatasa Cdc14 en el proceso de recombinación homóloga regulando la actividad y localización de la nucleasa Yen1. Cdc14 revierte las fosforilaciones inhibitoras de Cdk sobre Yen1 al final de mitosis permitiendo que esta nucleasa resuelva las uniones de Holliday que no han podido ser resueltas por otras nucleasas (Blanco et al., 2014; Eissler et al., 2014).

En células humanas, la actividad de los complejos CDK es necesaria para el procesamiento inicial de las DSBs mediante fosforilación y activación de la endonucleasa CtIP (Jazayeri et al., 2006), con el fin de generar cadenas de DNA sencillas y activar el *checkpoint*. La activación del *checkpoint* lleva a la reducción de la actividad de los complejos CDK conduciendo a la parada del ciclo. Además, esta reducción temporal en la actividad CDK favorece la desfosforilación de BRCA2, inhibida por fosforilación por CDK1 en Ser³²⁹¹, permitiendo la interacción de la proteína con los filamentos de RAD51 para promover el proceso de recombinación homóloga (Yata and Esashi, 2009).

Hipotetizamos que hCdc14B podría ser la fosfatasa responsable de la desfosforilación de BRCA2, de modo que tras daño en el DNA, hCdc14B desfosforilaría el citado residuo favoreciendo la nucleación de los filamentos de RAD51 y su carga en el DNA para que tenga lugar la reparación por recombinación homóloga. Para corroborar esta posible función sería necesario analizar mediante ensayos quinasa-fosfatasa *in vitro* la capacidad de hCdc14B de desfosforilar el citado residuo así como analizar la interacción entre ambas proteínas. De igual

modo, sería interesante comprobar si la depleción de hCdc14B reduce o inhibe la acumulación de RAD51 en el DNA.

Concluimos de esta parte del trabajo que la fosfatasa hCdc14B podría participar en la activación del *checkpoint* de daño en el DNA y que, posiblemente, tiene un papel directo en la reparación del daño generado. Tras roturas de doble cadena en el DNA generadas por distintos tipos de agentes genotóxicos, hCdc14B sale del nucléolo hacia el nucleoplasma para participar en la DDR. hCdc14B participaría en la activación del *checkpoint* de daño a través de la activación del complejo APC/C^{Cdh1} (Bassermann et al., 2008) y quizás también de su acción directa sobre Wee1. De igual modo, participaría en la reparación por recombinación homóloga a través de la regulación de alguno de sus componentes, entre los que la BRCA2, inhibido por fosforilación por CDK, sería un potencial candidato a analizar.

Esta función de hCdc14B en reparación de daño en el DNA se ve avalada tras la descripción de fenotipos en ratones *knockout* para Cdc14B por el grupo de Pumin Zang y colaboradores. Estos ratones deficientes en Cdc14B aunque son viables y no presentan anomalías obvias, desarrollan signos característicos de edad avanzada como cataratas o cifosis a edades bastante más tempranas que los ratones control. A nivel celular, los MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) obtenidos de estos ratones, si bien no muestran deficiencias en el *checkpoint* de daño al DNA, sí acumulan mayores niveles de daño endógeno, y frente a daño exógeno más células entran en senescencia que en el caso de los MEFs control, lo que sugiere que Cdc14B es necesaria para una eficiente reparación del daño (Wei et al., 2011b). Sin embargo, estos resultados no han sido corroborados por el grupo de Marcos Malumbres, que no observa deficiencias evidentes en la DDR de los MEFs carentes de Cdc14B generados en su laboratorio (Guillamot et al., 2011). La utilización de ratones con diferente fondo genético podría explicar estas diferencias observadas. Pero sin duda, se precisa de trabajo adicional para resolver estas diferencias.

El papel de las fosfatasas en la DDR está comenzando a ser investigado. La dificultad de trabajar con estas proteínas puede ser la razón por la que sus funciones en la DDR son, hasta el momento, poco conocidas. Como hemos comentado en la introducción, muchas de ellas forman complejos con subunidades reguladoras muy diversas que determinan su especificidad de sustrato, localización subcelular o actividad. Es frecuente además que varias fosfatasas actúen sobre una misma proteína. Esto puede deberse a un solapamiento de funciones entre las diferentes fosfatasas. También es probable que aunque varias fosfatasas desfosforilen la misma proteína, esta desfosforilación sea llevada a cabo por una u otra dependiendo del tipo de daño generado en el DNA, del momento del ciclo celular,...etc. Un ejemplo es γ H2AX, residuo que es desfosforilado por varias fosfatasas como PP1, PP2A, PP4, PP6 y Wip1 dependiendo de la localización de γ H2AX y del tipo de daño (Chowdhury et al., 2005; Chowdhury et al., 2008; Douglas et al., 2010b; Keogh et al., 2006; Nakada et al., 2008; Nazarov et al., 2003). Otro ejemplo sería la participación de Wip1 o PP4 en la reentrada en el

ciclo celular mediante la regulación de p53 tras daño, dependiendo de la fase del ciclo, G2 o G1 respectivamente (Shaltiel et al., 2014). Pese a la complejidad de los procesos de desfosforilación que tienen lugar en la DDR, es importante conocer el papel de estas fosfatasa y determinar cómo su actividad es regulada tras daño en el DNA.

CONCLUSIONES

1. La falta de hCdc14A no impide la salida de mitosis, lo que indica que hCdc14A no es esencial en este punto del ciclo.
2. hCdc14A no es la fosfatasa responsable de la desfosforilación de hCdc25A y Wee1 a la salida de mitosis, sustratos sin embargo de hCdc14A en la transición G2/M.
3. La carencia de hCdc14A produce defectos en el proceso de segregación cromosómica, caracterizados por la separación incompleta o parcial de las cromátidas hermanas y la formación de husos mitóticos anómalos.
4. La falta de hCdc14A impide la traslocación de Aurora B desde los centrómeros hacia la zona media del huso mitótico al inicio de anafase.
5. Las fosfatasas hCdc14 no son las responsables de desfosforilar a RepoMan a la salida de mitosis, desfosforilación necesaria para la función del complejo PP1 γ -RepoMan en la remodelación de la cromatina en esta fase del ciclo. Las fosfatasas tipo *PP2A-like* son las responsables, al menos en parte, de dicha regulación.
6. hCdc14B sale del nucléolo hacia el nucleoplasma en respuesta a roturas de doble cadena en el DNA ocasionadas por el agente genotóxico doxorubicina o por estrés oxidativo.
7. Células deficientes en hCdc14B muestran mayores niveles de daño en el DNA tras estrés oxidativo o tratamiento con doxorubicina. Por el contrario, células que sobreexpresan hCdc14B presentan una mayor eficiencia en la activación del *checkpoint* de daño al DNA así como menores niveles de daño tras los tratamientos mencionados.
8. La falta de hCdc14B sensibiliza a las células frente al tratamiento con doxorubicina, mientras que la sobreexpresión de la fosfatasa induce resistencia a dicho tratamiento.
9. hCdc14B participa en los procesos de reparación de roturas de doble cadena en el DNA. La falta de la fosfatasa tiene como consecuencia una reducción significativa de la eficiencia de reparación por recombinación homóloga (HR) y un efecto menos destacado en la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ). La sobreexpresión de hCdc14B tras estrés oxidativo produce un aumento en la eficiencia de reparación por ambas vías.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. CULTIVO Y TRANSFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES HUMANAS

1. Líneas celulares empleadas

Las líneas celulares humanas que fueron utilizadas en este trabajo se muestran en la Tabla M-1, en la que se detalla el nombre, origen, características y medio empleado para el cultivo de cada una de ellas.

LÍNEA CELULAR	PROCEDENCIA	CARACTERÍSTICAS	MEDIO DE CULTIVO
U2OS	Osteosarcoma	p53 wt	DMEM+10% FBS
U2OS Myc-hCdc14A wt	Osteosarcoma	Expresión inducible de Myc-hCdc14A (Tet OFF)	DMEM+10% FBS
U2OS Myc-hCdc14A PD	Osteosarcoma	Expresión inducible de Myc-hCdc14A PD (Tet OFF)	DMEM+10% FBS
HeLa TetON	Cáncer cérvico-uterino	Portadoras del transactivador de tetraciclina (Tet ON)	DMEM+10% FBS
HeLa TetON hCdc14B wt	Cáncer cérvico-uterino	Expresión inducible de Myc-hCdc14B (Tet ON)	DMEM+10% FBS
HeLa Tet ON hCdc14B PD	Cáncer cérvico-uterino	Expresión inducible de Myc-hCdc14B PD (Tet ON)	DMEM+10% FBS
HCT116 hCdc14B ^{lox/lox}	Cáncer colorrectal	El exón 2 de ambos alelos del gen está flanqueado por sitios <i>loxP</i>	McCoys+10% FBS
HCT116 hCdc14B ^{-/-}	Cáncer colorrectal	Deleción génica de ambos alelos	McCoys+10% FBS
RPE wt	Epitelio pigmentario de retina	Inmortalizadas con hTert	DMEM+10% FBS
RPE hCdc14A ^{lox/lox}	Epitelio pigmentario de retina	Deleción génica de un alelo. El exón 2 del otro alelo está flanqueado por sitios <i>loxP</i>	DMEM+10% FBS
RPE hCdc14A ^{-/-}	Epitelio pigmentario de retina	Deleción génica de ambos alelos	DMEM+10% FBS
HEK293T	Riñón embrionario	Células 293 con SV-40T insertado	DMEM+10% FBS

Tabla M-1. Líneas celulares empleadas

2. Medios y condiciones de cultivo

Las líneas celulares (Tabla M-1) se incubaron en placas para cultivo celular, creciendo en monocapa a 37°C y en una atmósfera de 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa. Los medios de cultivo empleados, DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) y McCoy's, fueron suplementados con 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*), L-Glutamina a 2mM (sólo en el caso del DMEM) y los antibióticos, penicilina (100 unidades/ml) y estreptomycin (100µg/ml), para evitar la contaminación del cultivo con microorganismos.

Con el fin de evitar que las células alcanzasen un 100% de confluencia en la placa, se realizaron pases cada 3 ó 4 días, empleando Tripsina-EDTA o Tryple (GIBCO Invitrogen), lo que comúnmente se denomina "tripsinización", para eliminar la adhesión de las células y así poder sembrar estas a una menor confluencia en nuevas placas. El medio McCoy's y los suplementos utilizados proceden de GIBCO Invitrogen. El medio DMEM utilizado procede de GIBCO Invitrogen o de Sigma.

Los clones estables de U2OS-Myc-hCdc14A y U2OS-Myc-hCdc14A PD, se mantuvieron en medio completo (DMEM + 10%FBS+ estreptomycin y penicilina) conteniendo geneticina a 400 µg/ml (G418, GIBCO Invitrogen), puromicina a 1 µg/ml (Sigma) y tetraciclina a 2 µg/ml (Sigma). Para inducir la sobreexpresión de las proteínas Myc-hCdc14A o Myc-hCdc14A PD, las células se incubaron en medio sin tetraciclina, tras haberlas lavado dos veces con el mismo medio para eliminar completamente la tetraciclina presente.

Los clones HeLa TetOn hCdc14B y HeLa TetON hCdc14B PD se crecieron en medio de cultivo DMEM completo complementado con geneticina a 400 µg/ml (G418, GIBCO Invitrogen) y puromicina a 1 µg/ml (Sigma). Para inducir la sobreexpresión de las proteínas, se añadió doxiciclina (un derivado de la tetraciclina) al medio (0,5 µg/ml).

Todas las células se manipularon en condiciones estériles, es decir, en campanas de flujo laminar y empleando materiales estériles para el contacto directo con el cultivo celular.

3. Congelación y descongelación de las células

Las células se conservan a largo plazo en nitrógeno líquido (-180°C), tras seguir un protocolo de congelación específico en el que se emplea DMSO (*Dimetilsulfóxido*) como agente protector que evita que las células se mueran por la formación de cristales durante el proceso de congelación.

Para llevar a cabo la congelación de las células, éstas fueron "tripsinizadas" y centrifugadas (1000 r.p.m. 5 min a temperatura ambiente), tras lo que se resuspendieron en medio de cultivo con 20% de FBS, al que se le añadió DMSO (Sigma) a una concentración final del 10%. Las células fueron congeladas a -70°C en contenedores con isopropanol durante una semana, y a continuación fueron introducidas en el tanque de nitrógeno líquido.

En el momento de su utilización, las células se descongelaron en un baño a 37°C, tras lo que se realizó un lavado con medio completo para eliminar el DMSO y, finalmente, las células se resuspendieron en medio fresco.

4. Sincronización de cultivos celulares

4.1 Sincronización de las células en G1/S mediante doble tratamiento con timidina

Las células se sembraron en placas p100 (100 mm de diámetro) y una vez adheridas se les añadió medio de cultivo con timidina (Sigma) a una concentración de 2,5 mM. La timidina es un nucleótido que utilizado en altas cantidades inhibe la síntesis de nucleótidos llevando a la parada de la replicación del DNA permitiendo así sincronizar las células en G1/S. Durante el primer tratamiento o “bloqueo”, las células se mantuvieron en presencia de esa concentración de timidina durante 24 horas. Tras este tiempo, la timidina fue eliminada por medio de dos lavados con PBS (tampón fosfato 10 mM a pH 7,2, NaCl 145 mM) y se añadió medio fresco sin timidina durante 12 horas, tiempo que denominamos de “liberación”, en el que las células progresan a lo largo del ciclo. A continuación, las células se incubaron en medio con timidina 2,5 mM durante otras 24 horas, lo que constituyó el segundo tratamiento o bloqueo de las células en el inicio de fase S o G1/S. Una vez concluido este tratamiento, se tomaron muestras de células paradas en la transición G1/S (tiempo 0), y se llevó a cabo la “liberación” del resto de las células, eliminando la timidina del medio como se ha descrito anteriormente, lo que permitió la posterior recogida de muestras a los distintos tiempos deseados a lo largo del ciclo celular.

4.2 Sincronización de las células en mitosis mediante tratamiento con nocodazol

Las células se sembraron en placas p100 y una vez adheridas se les añadió nocodazol (Sigma) al medio de cultivo a una concentración final de 50 ng/ml, durante 12-15 horas. El nocodazol es un agente químico que inhibe la polimerización de los microtúbulos mediante su unión a la β -tubulina, impidiendo así la correcta formación del huso mitótico e induciendo una parada del ciclo en prometafase. Tras el tratamiento, seleccionamos las células mitóticas (redondeadas, no adheridas) sacudiendo las placas (*shake off*) y recogiendo el medio con dichas células mitóticas. Estas células fueron recogidas para su procesamiento (muestra correspondiente a 0 horas) y el resto fueron incubadas en medio completo sin nocodazol (“liberación”) y recogidas a distintos tiempos para el análisis de la cinética de salida de mitosis.

5. Tratamiento de las células con otros reactivos

Para inhibir la actividad de los complejos CDK se utilizó Purvalanol A, a concentración 10µM durante distintos tiempos según el experimento.

Para inhibir las fosfatasas *PP2A-like* utilizamos ácido okadaico (O4511, Sigma) a una concentración de 0,5µM durante 2 horas.

6. Transfección de las células

6.1 Transfección con DNA plasmídico

De entre las distintas estrategias existentes, en nuestro estudio empleamos varios métodos de transfección con DNA, dependiendo de la línea celular.

6.1.1 Método del fosfato cálcico

Este método se utilizó para la línea celular HEK293T. Se basa en la obtención de un precipitado o agregado entre el CaCl₂ y el DNA en una solución salina de fosfatos, que será endocitado por las células.

En este método, por cada placa p100 se utilizaron 200µl de CaCl₂ 0,25M y 2-8 µg de ADN, sobre los que se añadieron gota a gota 200µl de HEBS (0,28M NaCl, 0,05M HEPES, 1,5mM Na₂HPO₄, pH 7-7.15) mientras se burbujeaba. Tras 2 minutos de incubación de la mezcla a temperatura ambiente, esta se añadió a las células. El medio de cultivo se cambió tras 12 horas de transfección.

6.1.2 Lipofección

Esta técnica se utilizó con el resto de líneas celulares. La lipofectamina es un reactivo que permite la formación de pequeños liposomas que engloban el DNA que se quiere introducir en la célula.

La transfección se llevó a cabo empleando el reactivo comercial *Lipofectamine 2000* (GIBCO Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Las células se sembraron 12-24 horas antes de la transfección, de forma que estuviesen a un 50% o 60% de confluencia en el momento de ésta.

6.1.3 Electroporación

Esta técnica se utilizó para la transfección de DNA plasmídico para el análisis de los sistemas de reparación de roturas de doble cadena en el DNA en las líneas celulares U2OS, HCT116 y HeLa.

La electroporación consiste en provocar un aumento significativo de la permeabilidad de la membrana plasmática mediante un campo eléctrico aplicado externamente. Cuando el voltaje atraviesa la membrana se forman poros que permiten la entrada de diversas moléculas, como por ejemplo DNA, sellándose tras un corto período.

Para cada reacción de transfección se utilizaron 10^6 células en suspensión recogidas mediante previa tripsinización y conteo en cámara *Neubauer*. Estas células se centrifugaron a 1.000 rpm durante 2 min y se resuspendieron en 100 μ l de medio RPMI sin suero y sin antibióticos (RPMI no suplementado). Sobre esta mezcla se añadió la correspondiente cantidad de DNA plasmídico pasándose este volumen a cubetas de electroporación. La electroporación se llevó a cabo en el equipo *NucleofectorTM* (Lonza) seleccionándose el programa adecuado según el tipo celular (X-001 para la línea celular U2OS, O-005 para HeLa y D-032 para HCT116). Una vez efectuado el proceso de electroporación, se recogieron las células y se plaquearon en placas de 6 pocillos.

6.2 Transfección con RNAs de interferencia

Para eliminar o reducir los niveles de expresión de las diferentes proteínas, empleamos RNAs de interferencia específicos (siRNA) (Tabla M-2). Este método permite el silenciamiento de genes de manera específica a nivel post-transcripcional, mediante pequeñas moléculas de RNA que se unen a la secuencia específica diana en el mRNA, induciendo su degradación. Los siRNAs se utilizaron a una concentración final de 100nM.

PROTEÍNA DIANA	PROCEDENCIA	SECUENCIA
hCdc14A	Invitrogen	5'-GGGACAUUGAUAGCCUGUUAUGUAA-3'
hCdc14B	Dharmacon	5'-GAUGCUACAUGGUUAUAUAUAUU-3'
B55α	Thermo	5'-GCAGAUGAUUUGCGGAUUATT-3'
Luciferasa (control negativo)	Dharmacon	5'-NNACGUACGCGGAUACUUCGAA-3'

Tabla M-2. Secuencias de los RNAs de interferencia utilizados

7. Infección de las células

7.1 Generación de líneas celulares inducibles mediante infección con retrovirus

El sistema utilizado para la generación de líneas celulares inducibles fue el “Retro-X-Tet-ON Advanced” de Clontech, el cual ofrece un nivel de expresión altamente regulado. El diseño del sistema se basa en el trabajo de Gossen y Bujard, 1992, e incluye las mejoras del sistema descritas en Urlinger et al., 2000.

7.1.1 Elementos del sistema Retro-X-Tet-ON Advanced

El sistema se compone de dos vectores: el transactivador y el vector de respuesta.

- **Vector transactivador** (*pRetro-X-Tet-ON Advance transactivator*): este vector expresa constitutivamente la proteína transactivadora rTA-Advance. Esta se caracteriza por tener un dominio mutante rTetR que permite la unión a sitios tetO en el promotor del vector de respuesta, en presencia de doxiciclina. Este vector porta el gen de resistencia a Neomicina (Figura M-1). En el caso de nuestros experimentos, nuestras células de origen (HeLa Tet ON) ya portan este vector.

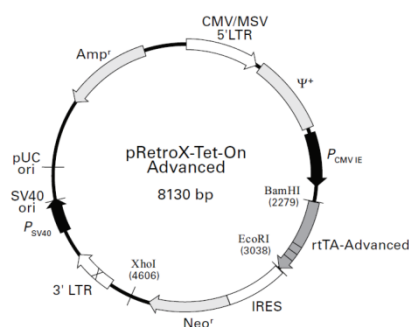


Figura M-1. Vector transactivador *pRetro-X-Tet-On Advanced*. Representación esquemática del vector transactivador *pRetro-X-Tet-On Advanced*.

- **Vector de respuesta** (*pRetroX-Tight-Pur*): contiene P_{Tight} , que es el promotor de respuesta inducible que controla la expresión del gen de interés. Este promotor se compone de siete repeticiones de una secuencia tetO modificada, seguidas de un promotor CMV modificado ($P_{minCMV\Delta}$). P_{Tight} carece de sitios de unión para factores de transcripción endógenos de mamífero, lo que favorece la ausencia de expresión basal. Tras la inducción (por presencia de doxiciclina en el medio), la proteína rTA-Advanced se une al promotor P_{Tight} en los sitios tetO lo que provoca el inicio de transcripción del gen de interés. Este vector porta el gen de resistencia a Puomicina (Figura M-2).

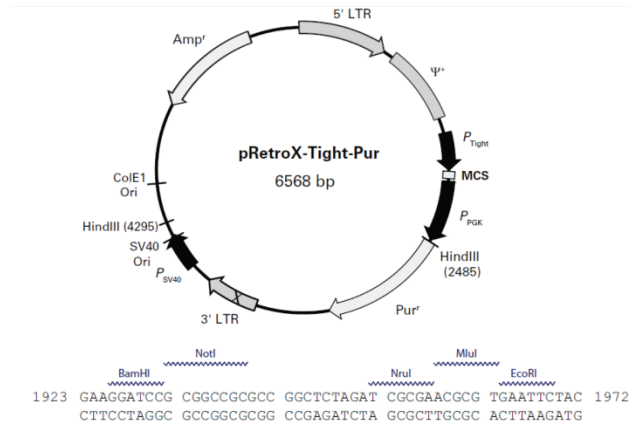


Figura M-2. Vector de respuesta *pRetro-X-Tight-Pur*. Representación esquemática del vector de respuesta *pRetro-X-Tight-Pur*.

Una vez introducido el sistema en la línea celular, este permite la expresión controlada del gen de interés mediante el ajuste de la concentración del inductor del sistema, la doxiciclina. Este sistema inducible “Retro-X-Tet-ON Advance” mantiene el sistema basal (apagado) en ausencia de doxiciclina en el medio de cultivo, mientras que la inducción se produce con la adición de la misma (Figura M-3).

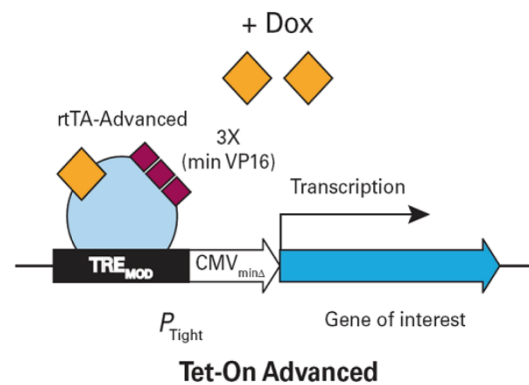


Figura M-3. Inducción de la unión de la proteína transactivadora rTA al promotor P_{Tight} mediada por doxiciclina. La proteína transactivadora rTA-Advance se expresa de forma constitutiva. En presencia de doxiciclina, esta proteína se une mediante su dominio rTetR a sitios tetO en el promotor P_{Tight} iniciándose la transcripción del gen de interés (hCdc14B o hCdc14B PD en nuestro caso).

7.1.2 Establecimiento del sistema inducible en líneas celulares

En nuestro caso partimos de células HeLa Tet ON que portan el vector transactivador. A partir de este punto se procedió al proceso de infección con retrovirus portadores del vector de respuesta conteniendo el gen de interés. El clonaje del cDNA de interés en el vector de respuesta, en este caso hCdc14B, hCdc14B PD, Flag-hCdc14B y Flag-hCdc14B PD, se llevó a cabo siguiendo el protocolo citado en el apartado 1 dentro de la sección II.

El procedimiento de infección consistió en un primer paso de co-transfección de células HEK293T con el vector de respuesta que contenía nuestro gen de interés junto con el vector pCL-Ampho, que codifica para las proteínas de la envuelta del retrovirus. De esta manera, la maquinaria celular produjo las partículas víricas necesarias para el proceso de infección. Tras 36 horas de transfección, se añadió medio nuevo a las células HEK293T. Tras 12 horas de incubación, se recogió el medio centrifugándolo a 1.500 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue filtrado utilizando filtros de 0,45µm, que permiten el paso de las partículas víricas pero no de las células, y finalmente se le añadió polibreno (*hexadimethrine bromide*, 4 µg/ml), polímero catiónico que incrementa la eficiencia de infección. Este medio que contenía los retrovirus se utilizó para la infección de las células de interés, en nuestro caso la línea celular HeLa Tet ON. Este protocolo se repitió por segunda vez pasadas 12 horas tras la primera infección. Al cumplirse 24 horas desde la primera infección, las células se tripsinizaron y recogieron. Estas células se repartieron en placas con medio con puromicina realizando diferentes diluciones (desde 1:1000 a 1:10000) para permitir el crecimiento de clones fácilmente aislables. Cada uno de los clones se aisló y se creció hasta obtener células suficientes. Dichas células se caracterizaron y se congelaron.

Para el proceso de caracterización se determinaron mediante RT-PCR los niveles basales de mRNA de hCdc14B en los clones sin inducir así como los niveles de este mRNA tras un tratamiento de inducción con doxiciclina (0,5 µg/ml) durante 12 horas. También comprobamos los niveles de expresión proteica tras inducción con doxiciclina, mediante *western blot*.

7.2 Delección génica condicional de hCdc14A en células RPE hCdc14A^{-flox}

Las células RPE hCdc14A^{-flox}, descritas en el artículo Mocciaro et al., 2010, se caracterizan por presentar delección génica de uno de los alelos de hCdc14A, mientras que el otro presenta el exón 2 flanqueado por sitios *loxP*. Estas células fueron infectadas con adenovirus portadores del gen de la Cre recombinasa o portadores del gen de GFP como control de infección. Al expresarse la enzima Cre recombinasa, esta actúa delecionando la secuencia de DNA entre los dos sitios *loxP* generando delección del otro alelo. La excisión del exón 2 da lugar a la generación de una proteína final que no es funcional. La cantidad de adenovirus utilizada para la infección fue de 300 partículas víricas por célula (*RAPAdTM*

System, Gene transfer Vector Core). Tras 12 horas de incubación con los virus, se retiró el medio de infección y se añadió medio nuevo.

II. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

1. Construcción de plásmidos de DNA recombinante

Los plásmidos generados en este trabajo se obtuvieron mediante técnicas clásicas de clonaje, utilizando diferentes vectores. Estos plásmidos se amplificaron mediante transformación y selección de células competentes de *E. coli* (DH5 α) y se confirmaron por análisis con enzimas de restricción y posterior secuenciación.

1.1 Amplificación de DNA mediante PCR

Las reacciones de amplificación de DNA mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) se realizaron en un termociclador *Minicycler* de Eppendorf. Las características de la PCR fueron diferentes en función del tamaño del fragmento a amplificar y de la temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos utilizados. La PCR se llevó a cabo en presencia de los oligonucleótidos específicos para cada caso, el DNA molde, los dNTPs (desoxinucleósido-trifosfato) y una Taq polimerasa (polimerasa termoestable) de alta fidelidad (*High Fidelity* de Roche Diagnostics o *Pfu* de Stratagene). El resultado de la PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa, y los productos obtenidos se purificaron usando el sistema *Jet Quick PCR Product Purification Spin Kit* de Genomed para su posterior clonaje en el vector de interés.

Para nuestros experimentos amplificamos los insertos indicados en la tabla M-3 a partir de un plásmido de origen con oligonucleótidos que nos permitieron obtener el inserto de interés flanqueado por sitios concretos para enzimas de restricción.

DNA molde	OLIGOS	INSERTO
pCEFL-Flag-hCdc14B	(5')CGCGGATCCATGAAGCGGAAAAGCGAGCG(3') (5')CGCGGATCCCTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCCATT GATCCACGC(3')	Flag-hCdc14B
pCEFL-Flag-hCdc14B PD	(5')CGCGGATCCATGAAGCGGAAAAGCGAGCG(3') (5')CGCGGATCCCTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCCATT GATCCACGC(3')	Flag-hCdc14B PD

Tabla M-3. DNA molde y oligonucleótidos utilizados para el clonaje del cDNA de hCdc14B o de su forma inactiva.

1.2 Digestión del DNA con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción son nucleasas que cortan el DNA de doble cadena cuando reconocen un patrón de secuencia específico. La digestión con enzimas de restricción, tanto del vector como del inserto, permite generar extremos compatibles que, posteriormente, pueden ser unidos por acción de la DNA ligasa. Estas enzimas y el DNA se incubaron a 37°C en el tampón adecuado, suministrado por el fabricante. Roche Diagnostics, Fermentas y New England Biolabs fueron las casas comerciales que suministraron las enzimas de restricción empleadas en este trabajo.

En algunos casos, el vector vacío lineal obtenido por digestión fue tratado con fosfatasa alcalina (*calf intestine alkaline phosphatase*, Roche Diagnostics) para eliminar los grupos fosfato de los extremos 5' y así evitar la religación de los extremos del plásmido lineal favoreciendo el proceso de clonaje.

1.3 Electroforesis de fragmentos de DNA en geles de agarosa

Los fragmentos de DNA se separaron en función de su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa, preparados a la concentración adecuada (entre el 0,8% y el 1,5%, según el tamaño de los fragmentos a separar). A las muestras de DNA se les añadió tampón de carga 6x (glicerol al 30% y el colorante azul de bromofenol al 0,25%) que permite seguir la migración de los fragmentos de DNA en los geles. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante (90V) y se empleó como tampón de carrera TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM). Para la visualización del DNA, a los geles se les añadió bromuro de etidio (0,3 µg/ml) (Sigma), que se intercala entre las bases nitrogenadas y emite fluorescencia al exponerse a luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular se usó *DNA Ladder de 1Kb* (Invitrogen) y las imágenes se capturaron con una cámara digital acoplada al analizador de imagen *Gel Doc 2000* de Bio Rad.

1.4 Purificación y ligación de fragmentos de DNA

La purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se llevó a cabo cortando la banda de interés y procesándola con el sistema *Jet Quick Gel Extraction Spin kit* de Genomed, según las instrucciones del fabricante.

Las construcciones de DNA recombinante se obtuvieron mediante ligación de los fragmentos purificados (inserto y vector). Para la ligación se utilizó la ligasa de DNA del fago T4 siguiendo las especificaciones del fabricante (Fermentas). La mezcla de la ligación se utilizó para transformar directamente *E. coli*.

Siguiendo el proceso de clonaje descrito, se obtuvieron los siguientes plásmidos:

- **pRetro-X-Tight-Pur-hCdc14B**
- **pRetro-X-Tight-Pur-hCdc14B PD**
- **pRetro-X-Tight-Pur-Flag-hCdc14B**
- **pRetro-X-Tight-Pur-Flag-hCdc14B PD**

1.5 Transformación de *Escherichia coli*

El método empleado para la transformación de cepas de *E. coli* (DH5 α) competentes fue el descrito por *Kurshner* en 1978. En algunos casos, la transformación se llevó a cabo siguiendo el protocolo de “transformación en un minuto” descrito por *Golub* en 1988. Las células transformadas se sembraron en una placa Petri con LB-agar que contenía el antibiótico de selección correspondiente (ampicilina 100 μ g/ml o kanamicina 200 μ g/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C. Las colonias resultantes se crecieron posteriormente en medio líquido para la purificación del DNA plásmidico.

1.6 Aislamiento de DNA plasmídico a partir de *E. coli*

La obtención de DNA plasmídico a partir de *E. coli* a pequeña escala se llevó a cabo mediante el método de la lisis alcalina (*Birnboim and Doly*, 1979), conocido comúnmente como “Miniprep”. La validación del plásmido se llevó a cabo mediante digestión con enzimas de restricción específicas y, en algunos casos, por secuenciación.

Para la obtención de DNA de calidad a gran escala (*Maxiprep*) se empleó el sistema comercial *JetStar Maxi* (*Genomed*) según las especificaciones del fabricante.

1.7 Determinación de la concentración de ácidos nucleicos

La concentración de DNA se determinó midiendo la absorbancia a $\lambda=260$ nm (en cubeta de cuarzo) en un espectrofotómetro U-2001 (*Hitachi*), y considerando la relación de absorbancia a $\lambda=260/280$ nm para estimar el grado de pureza de la preparación.

1.8 Secuenciación del DNA

Las construcciones de DNA recombinante, en las que el inserto fue obtenido mediante PCR, fueron comprobadas mediante secuenciación. La secuenciación de DNA se realizó de utilizando un secuenciador *ABI Prism 377* de *Perkin-Elmer* en el Servicio de Análisis Genómico del Centro de Investigación del Cáncer.

2. Análisis de mRNA

La obtención de RNA total se realizó empleando el sistema *RNAspin Mini* (*Amersham*) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El RNA se cuantificó utilizando un *NanoDrop*. La síntesis de cDNA a partir de este RNA (1 μ g) se llevó a cabo con el sistema *SuperScript First-Strand Kit* (*Invitrogen*) según las instrucciones del fabricante. El análisis mediante RT-qPCR se llevó a cabo usando el reactivo *iQTM SYBR® Green Supermix* (*BioRad*) con el *iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System* (*BioRad*) junto con oligonucleótidos específicos (Tabla M-4).

OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIA
hCdc14A	5'-GTT CCT GAA CAT CTG TGA-3' 5'-GCA TGT GTA AAC CTG TAG-3'
hCdc14B	5'-GTG CCA TTG CAG TAC ATT-3' 5'-AGC AGG CTA TCA GAG TG-3'
18S rRNA (Control)	5'-CGC CGC TAG AGG TGA AAT TC-3' 5'-CT TCG CTC TGG TCC GTC TT-3'
B55 α	5'-ATTCGGCTA TGTGACATGAG-3' 5'-GACCTGTTACT GGGATCTTC-3'

Tabla M-4. Oligonucleótidos utilizados para la RT-qPCR

III. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

1. Obtención de extractos proteicos totales

Para poder analizar las proteínas celulares es preciso extraerlas de las células mediante un tampón de extracción o buffer de lisis. Existen diversos tipos de soluciones tampón para este fin, con mayor o menor concentración de detergente y/o sales en función de cada situación experimental.

Los extractos proteicos se obtuvieron directamente a partir de células en cultivo, que fueron lavadas con PBS frío y recogidas directamente en tampón de lisis, o bien, a partir de muestras de células que habían sido tripsinizadas, recogidas por centrifugación, lavadas, y congeladas en hielo seco y guardadas a -70 °C hasta su procesamiento. En ambos casos, las células se mezclaron bien con el tampón de lisis (Tris-Cl 20mM a pH 8, NaCl 150 mM, NP40 0,5%, DTT 1mM e inhibidores de proteasas y fosfatasa: ortovanadato sódico 1 mM, NaF 10 mM, β -Glicerofosfato 10mM, PMSF 1mM, aprotinina 10 μ g/ml, leupeptina 10 μ g/ml y pepstatina 2 μ g/ml) y se incubaron durante 30 minutos en hielo dando vortex frecuentemente. A continuación, estos extractos se centrifugaron durante 15 minutos a máxima velocidad para eliminar los restos celulares no solubles.

2. Valoración de la concentración de proteínas

Para cuantificar la concentración de proteína de los extractos totales utilizamos el sistema colorimétrico BCA (Pierce), siguiendo las indicaciones del fabricante. La intensidad de color de cada reacción colorimétrica, que depende de la cantidad de proteína presente en cada muestra, fue cuantificada en el espectrofotómetro. A continuación, la concentración de proteínas de cada muestra se determinó refiriendo los valores a una recta patrón de concentraciones conocidas de BSA.

3. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

Mediante electroforesis en una dimensión en geles de SDS-PAGE (*Sodium-DodecylSulfate-Polyacrilamide gel electrophoresis*, geles de SDS-poliacrilamida) se pueden separar las proteínas de una muestra en función de su peso molecular (Laemmli, 1970), ya que el SDS es un detergente aniónico que rodea a las proteínas confiriéndoles una carga negativa proporcional a su tamaño.

Antes de cargar las muestras de extracto proteico en el gel, se les añadió un tampón de carga que contiene DTT (*Ditiotreitol*) como agente reductor (Tris-HCl pH 6,8, 80mM, DTT 5mM, SDS 2%, glicerol 7,5%, EDTA 5mM, azul de bromofenol 0,002%) y se hirvieron durante 5 minutos a 100°C. Este proceso favorece la desnaturalización de las muestras.

Los geles SDS-PAGE pueden contener distintos porcentajes de poliácridamida, de modo que altos porcentajes de esta son adecuados para separar proteínas de bajo peso molecular y viceversa. Por consiguiente, en función del peso molecular de las proteínas que deseamos analizar se utilizaron geles con distintos porcentajes de poliácridamida (entre 8 y 12%).

En cada gel SDS-PAGE, cargamos cantidades de extracto proteico equivalentes de todas las muestras, entre 10 y 40 µg, dependiendo de la proteína a detectar y de la línea celular. Se utilizaron marcadores de peso molecular adecuados según el tipo de análisis de GIBCO Invitrogen. La electroforesis se llevó a cabo utilizando el sistema *Mini-Protean* de Bio Rad, en condiciones desnaturalizantes debido al tampón de carrera empleado (Tris 25mM, glicina 200mM, SDS 0,5%).

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se sometieron a electrotransferencia e inmunodetección, por la técnica de *Western blot*.

4. Análisis de proteínas mediante *Western Blot*

Los geles SDS-PAGE se electrotransfirieron durante 1,5-2 horas a voltaje constante (100V) a una membrana de nitrocelulosa (*Hybond ECL* de Amersham), utilizando el sistema *Mini-Transblot* de Bio Rad. Empleamos como tampón de transferencia: CAPS (ácido 3-(ciclohexil-amino)-1-propanesulfónico) 10 mM, etanol 10%, a pH 11). La eficiencia de la transferencia se comprobó tiñendo la membrana con el colorante Ponceau S (0,3% Ponceau S + 3% Ácido Tricloroacético).

A continuación, la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de PBS (Tampón fosfato 10 mM a pH 7,2, NaCl 145 mM) que contiene leche en polvo al 5% (*Sveltesse* Nestlé) y detergente Tween-20 al 0,05%.

La detección de proteínas se realizó mediante anticuerpos monoclonales o policlonales. Se utilizaron dos anticuerpos, uno primario que reconoce específicamente a la proteína de interés, y otro secundario que reconoce al anterior y está conjugado con una enzima, como la peroxidasa, que cataliza la reacción de detección (Tabla M-5). La incubación con el anticuerpo

primario se llevó a cabo en la solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Tras esto, se lavó la membrana cuatro veces durante 5 minutos con una solución que contiene PBS con Tween-20 al 0,05%. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó también en solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente, y después, se lavó la membrana en PBS con Tween-20 al 0,05% dos veces durante 10 minutos y se llevó a cabo un último lavado sólo con PBS.

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
Anti-HA	1:1000	12CA5,Boheringer Mannheim
Anti-Myc	1:1000	9E10; Sigma-Aldrich
Anti-Flag	1:500	200474; Agilent Technologies
Anti-GFP	1:1000	(B-2) sc-9996, Santa Cruz
Anti-GFP	1:1000	632381, Linving colors
Anti-Wee1	1:500	sc-9037; Santa Cruz Biotechnology
Anti-β-Actina	1:5000	AC-15; Sigma-Aldrich
Anti-Ciclina B1	1:1000	sc-752; Santa Cruz Biotechnology
Anti-Cdk1	1:1000	sc-54; Santa Cruz Biotechnology
Anti-pTyr15(Cdk1)	1:1000	9111; Cell Signaling
Anti-pSer10(HH3)	1:500	06-570; Millipore
Anti-Cdc14A	1:500	DCS-291; Neo Markers (descatalogado)
Anti-Cdc14B	1:500	34-8900, Invitrogen
Anti-pSer(CDKs)	1:500	2324; Cell Signaling (descatalogado)
Anti-CDCA2 (RepoMan)	1:500	HPA030049, Sigma
Anti-pSer317(Chk1)	1:1000	2344, Cell signaling
Anti-Chk1	1:2000	(G-4) sc-8408, Santa Cruz
Anti-pSer139(H2AX)	1:1000	9718, Cell Signaling
ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
Anti-mouse	1:2000	NA931 Amersham
Anti-rabbit	1:2000	NA934 Amersham
Anti-goat	1:2000	sc-2020, Santa Cruz Biotechnology
Anti-rat	1:2000	NA935 Amersham

Tabla M-5. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la detección mediante *western blot*

Para el revelado se utilizó, en función de la proteína, el sistema de quimioluminiscencia ECL de Amersham o *Supersignal* de Pierce, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. La quimioluminiscencia se detectó mediante películas de autorradiografía (*Hyperfilm ECL* de Amersham o AGFA).

En algunos casos se cuantificó la intensidad de las bandas proteicas de interés con el programa *Quantity One* de Bio Rad.

IV. INMUNOPRECIPITACIÓN

Las inmunoprecipitaciones permiten purificar proteínas por su unión a un anticuerpo específico, formando inmunocomplejos. La purificación de estos inmunocomplejos se realiza gracias a la utilización de la proteína A o la proteína G (unidas a una matriz magnética, *Dynabeads* de Invitrogen, o de *Sepharosa* de GE Healthcare), que presentan afinidad por la región constante de las cadenas de las inmunoglobulinas.

Las inmunoprecipitaciones se realizaron a partir de 500µg-2mg de extracto total según la proteína de interés, el anticuerpo correspondiente se añadió en proporción 1µg/mg extracto y las *Dynabeads* o la Proteína G/A *Sepharose* se añadieron en proporción 10µl/mg de extracto. Todo ello se incubó durante 1-3 horas a 4°C en rotación. Posteriormente, los inmunoprecipitados, unidos a las *Dynabeads* o las bolas de *sepharosa* lavaron 3-5 veces con tampón de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas.

V. ANÁLISIS PROTEÓMICOS

Para estos análisis se utilizaron inmunoprecipitados de proteínas fosforiladas en residuos de serina por los complejos CDK, procedentes de células deplecionadas para hCdc14A o células control. Estos inmunoprecipitados se obtuvieron con un anticuerpo que reconoce residuos de serina fosforilados por complejos CDK (2324; *Cell Signaling*) y fueron resueltos mediante electroforesis bidimensional que permite la separación de las proteínas en función de su peso molecular así como de su carga. Por último, los geles fueron teñidos con tinción de plata. Las proteínas de interés fueron seleccionadas, extraídas del gel y fragmentadas en péptidos mediante la digestión con tripsina y analizadas mediante espectrometría de masas. A partir de los resultados obtenidos se utilizó el motor de búsqueda Mascot que consideró como resultado significativo aquellas proteínas que fueron identificadas con una puntuación superior a 65. Estos análisis proteómicos fueron realizados en la Unidad de Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer (CIC).

VI. INMUNOCITOQUÍMICA Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Se analizó la localización de GFP-RepoMan en diferentes etapas de la mitosis así como de GFP-hCdc14B tras someter a las células a distintos tipos de tratamiento, mediante microscopía de fluorescencia.

Las células se sembraron e incubaron sobre cubreobjetos tratados previamente con poli-L-Lisina (*Sigma*) para mejorar la adherencia. Tras 24 horas de transfección con GFP-RepoMan o GFP-hCdc14B, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 15 minutos. Tras esto, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con 0,15% Tritón X-100 en buffer CB durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron 2 veces con PBS durante 5 minutos y se incubaron con DAPI (2 µg/ml) en PBS durante 5 minutos, todo ello en

oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con agua MilliQ (2 veces) y los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos usando *SlowFade* (Invitrogen) cuyos bordes se sellaron con laca de uñas. Para la observación de las muestras se empleó un microscopio (Zeiss) acoplado a una cámara (Hamamatsu ORCA-ER). La adquisición de las imágenes se llevó a cabo con el programa Openlab.

Para el estudio de la localización subcelular de determinadas proteínas como Aurora B o el marcador nucleolar Nop1, así como el estudio de la morfología de los husos mitóticos en células en diferentes condiciones mediante la detección de α -tubulina, se utilizó la técnica de inmunofluorescencia seguida de la posterior observación de las muestras mediante microscopía de fluorescencia.

Las células se sembraron e incubaron sobre cubreobjetos, tratados previamente con poli-L-Lisina (*Sigma*) para mejorar la adherencia. A continuación las células adheridas a los cubreobjetos fueron lavadas con PBS/Ca²⁺ Mg²⁺ (PBS con CaCl₂ 1mM y MgCl₂ 0,5 mM) y fijadas con MeOH (-20°C) o PFA al 4% durante 30 minutos. Tras esto, se realizaron tres lavados con PBS, se permeabilizaron las células con Tritón X-100 al 0,2% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 3 veces durante 5 minutos. A continuación, se llevó a cabo el bloqueo de las células con BSA al 0,2% en PBS, para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo. La incubación con el anticuerpo primario (Tabla M-6) en solución de bloqueo con BSA se llevó a cabo durante 1 hora, tras la cual las células se lavaron tres veces, durante 10 minutos cada vez, con la propia solución de bloqueo. Tras esto, se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo secundario unido al fluorocromo (Tabla M-6), diluido en solución de bloqueo durante 30 minutos a RT y en oscuridad. Por último, se realizaron tres lavados con abundante solución de bloqueo, seguido de incubación con DAPI (2 μ g/ml) en PBS durante 5 minutos para la tinción nuclear, todo ello en oscuridad. Los cubreobjetos se lavaron con agua, se dejaron secar y se montaron sobre los portaobjetos usando *SlowFade* (Invitrogen). Para la observación de las muestras se emplearon los microscopios Zeiss o Leica DM600B, dependiendo del experimento, acoplados a sus respectivas cámaras. La adquisición de las imágenes se llevó a cabo con los programas *Openlab* o *Metamorph*, respectivamente.

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
Anti- α tubulina	1:7500	Clon GTU-88, T6557, Sigma
Anti-Aurora B	1:500	611082; BD transduction laboratories
Anti-Nop1	1:200	MCA-38F3, EnCor Biotechnology Inc.
ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
Anti-mouse Alexa Fluor 488	1:500	A11001, Invitrogen
Anti-mouse CY3	1:500	115-165-003, Jackson immunoResearch Laboratoires

Tabla M-6. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia

VII. ANÁLISIS DE LOS SISTEMAS DE REPARACIÓN DE ROTURAS DE DOBLE CADENA EN EL DNA

1. Descripción de los plásmidos de análisis de los sistemas de reparación HR y NHEJ

El plásmido utilizado para el análisis de la eficiencia de la vía de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ) contiene un gen GFP que a su vez presenta un intrón de 3 Kb del gen Pem1. Este intrón contiene un exón adenoviral flanqueado por secuencias de reconocimiento para las endonucleasas HindIII e I-SceI (Figura M-4). Este plásmido NHEJ intacto es GFP negativo puesto que el exón adenoviral interrumpe la ORF de GFP. Tras inducción de las DSBs, por digestión con la correspondiente endonucleasa, el exón adenoviral es eliminado, de forma que solo si actúa el sistema de reparación NHEJ se reestablece la expresión del gen GFP.

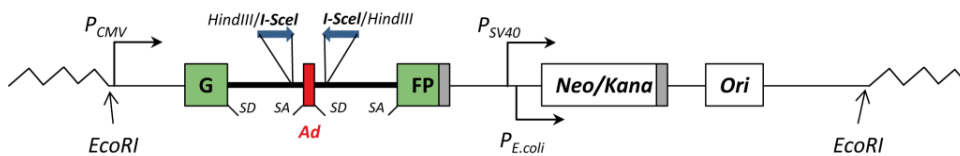


Figura M-4. Esquema del plásmido utilizado para analizar la eficiencia de reparación de la vía NHEJ. El plásmido utilizado para el análisis de la eficiencia de reparación de la vía NHEJ contiene un gen GFP (mostrado en verde) que a su vez contiene un intrón de 3Kb del gen Pem1 (representado por una barra negra). Este intrón contiene un exón adenoviral (mostrado en rojo) flanqueado a ambos lados por secuencias de reconocimiento para las endonucleasas HindIII e I-SceI.

En el plásmido utilizado para el análisis de la eficiencia de la vía de reparación por recombinación homóloga (HR), el primer exón GFP contiene una deleción de 22 pares de bases combinada con inserción de tres sitios de restricción I-SceI/HindIII/I-SceI. Esta deleción asegura que el gen de GFP no pueda ser reconstituido por unión de los extremos vía NHEJ. Los dos sitios I-SceI presentan orientación invertida de forma que la digestión con esta enzima genera extremos incompatibles. El tercer exón de GFP carece de ATG y va seguido de otro intrón Pem1 (Figura M-5). La construcción intacta es GFP-negativa. Tras inducción de las DSB por digestión con la correspondiente endonucleasa, el gen GFP es reconstituido siempre que se lleve a cabo la reparación por HR.

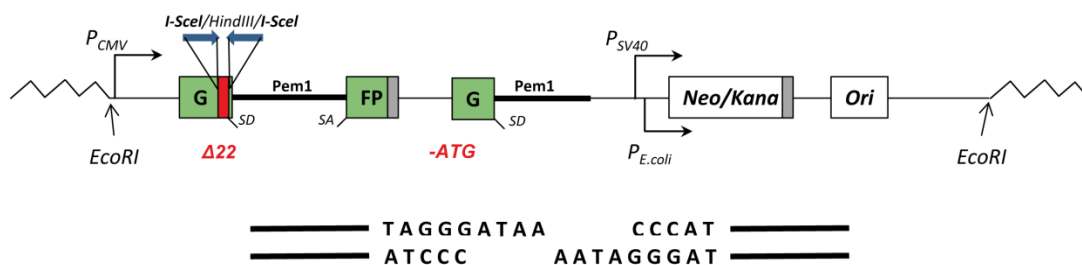


Figura M-5. Esquema del plásmido utilizado para analizar la eficiencia de la vía HR. El plásmido utilizado para el análisis de la eficiencia de reparación por la vía HR contiene un primer exón GFP (mostrado en verde) con una delección de 22 pares (mostrada en rojo) de bases combinada con inserción de tres sitios de restricción I-SceI/HindIII/I-SceI. El tercer exón de GFP (en verde) carece de ATG y va seguido de otro intrón Pem1 (representado por una barra negra).

2. Linealización los plásmidos de HR y NHEJ mediante digestión con endonucleasas

Los plásmidos de análisis de los sistemas HR o NHEJ se linealizaron mediante digestión con las enzimas de restricción I-SceI o HindIII, respectivamente. Para ello, se incubaron 10 µg del plásmido con 1 µl de enzima y 10 µl de su respectivo buffer en un volumen final de 100 µl por cada reacción. Las reacciones de digestión con la enzima I-SceI se incubaron durante 4 horas a 37°C para una óptima restricción, mientras que las reacciones con HindIII se incubaron a 37°C durante 2 horas. Ambos plásmidos digeridos fueron purificados por columna utilizando el kit de purificación *JetQuick™ PCR Purification Spin Kit (Genomed)* y posteriormente comprobados mediante electroforesis en gel de agarosa.

3. Transfección

Para el proceso de transfección mediante electroporación (descrito previamente), se utilizaron células creciendo exponencialmente, las cuales fueron transfectadas con 0,5 µg del plásmido NHEJ o 2 µg del plásmido HR, ambos previamente linealizados, junto con 2 µg del plásmido pDsRed-N1 como control de transfección. La transfección mediante electroporación se llevó a cabo en el *Amaxa Nucleofector* utilizando el programa adecuado de electroporación según el tipo celular siguiendo las indicaciones del fabricante.

4. Análisis mediante citometría de flujo

Tras 48 horas de transfección se recogieron las células, centrifugándolas a 1.500 rpm durante 5 minutos y resuspendiéndolas en 500 µl de PBS en tubos de FACS para su análisis inmediato mediante citometría de flujo (descrito a continuación).

VIII. CITOMETRÍA DE FLUJO

1. Análisis de ciclo celular

La citometría de flujo o FACS (*Fluorescence Analyzer Cell Sorter*) permite determinar el contenido de DNA de las células, lo que nos informa acerca de la fase del ciclo celular en la que se encuentran. En el perfil de FACS típico de células humanas creciendo de forma asíncrona, se aprecia un pico mayoritario con un contenido de DNA 2N (correspondiente a células en G1), y un pico menor correspondiente a células en G2/M, con doble contenido de DNA (4N), entre ambos picos se distingue una meseta que corresponde a células con un contenido intermedio de DNA (entre 2N y 4N), correspondiente a células en fase S. El pico denominado pre-G1, de células con un contenido en DNA inferior a 2N, corresponde principalmente a células apoptóticas.

Las muestras para análisis por citometría fueron recogidas por tripsinización y lavadas con PBS mediante centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en 1 ml de etanol 70% frío y se incubaron al menos 1 hora en hielo o a 4°C durante la noche, para fijarlas. Tras esto, se llevaron a cabo dos lavados con PBS (centrifugaciones a 2000 rpm durante 10 minutos) y las células se resuspendieron en 0,5 ml de solución de marcaje con yoduro de propidio (4 µg) y RNAsa (10 µg) (Roche), y se incubaron durante 1 hora a 37°C en agitación y oscuridad, tras lo que finalmente fueron adquiridas en un equipo *FACScalibur* (Becton-Dickinson) y analizadas con el programa *Cell Quest Pro*.

2. Análisis de emisión de fluorescencia para determinar la eficiencia de reparación

El análisis de las células transfectadas para determinar la eficiencia de los sistemas de reparación, se llevó a cabo mediante su adquisición en el equipo *BD Accuri™ C6* (*BD Biosciences*). Primero se adquirieron las muestras de células no transfectadas para determinar los parámetros correspondientes a los controles negativos. Posteriormente, se analizaron las células transfectadas con los plásmidos portadores de los genes reporteros GFP o DsRed determinado con ello las regiones positivas y negativas para cada fluoroforo. Tras caracterizar los controles, ajustar el voltaje y llevar a cabo la compensación de color se procedió a analizar las diferentes muestras.

El análisis de los resultados se llevó a cabo utilizando el *software BD Accuri C6* (*BD Biosciences*). Como se muestra en la Figura M-6, los eventos de transfección marcados en verde muestran las células positivas para GFP, los marcados en rojo corresponden a las células positivas para pDsRed, mientras que los marcados en azul representan las células que son positivas para ambos marcadores. El porcentaje de eficiencia de reparación se obtuvo normalizando las células positivas para GFP frente a las células positivas para DsRed en cada

uno de los ensayos. El valor obtenido se dividió entre otro valor obtenido de dividir las células positivas para GFP entre las células positivas para DsRed en células transfectadas con el plásmido control que presenta la GFP intacta al carecer de los exones intermedios. Este valor refleja la capacidad de expresión de dicho plásmido en las células.

Para los ensayos de eficiencia de reparación por HR se obtuvo el valor medio del análisis a partir de 5 valores independientes. En el caso de la reparación por NHEJ, se obtuvo el valor medio de eficiencia de reparación a partir de 3 valores independientes. Los valores medios así como las desviaciones estándar se representaron en gráficas.

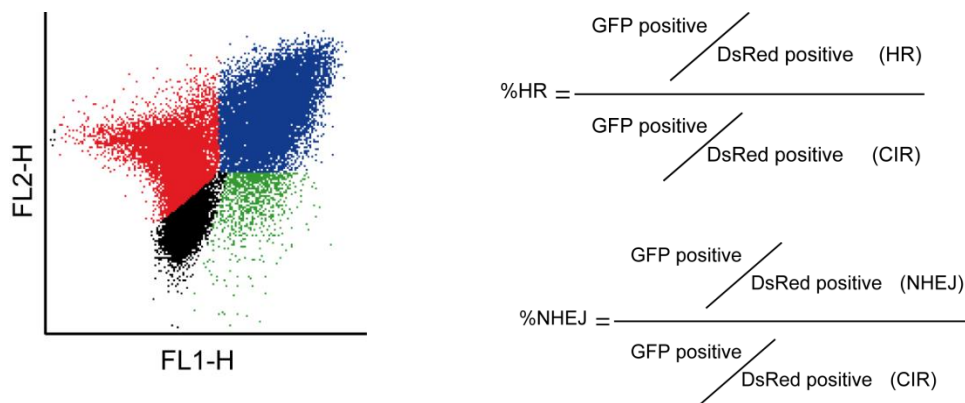


Figura M-6. Representación gráfica de las diferentes poblaciones celulares y fórmulas para el cálculo del porcentaje de la eficiencia de reparación. En verde se muestran las células positivas para GFP. En rojo, las positivas para DsRed. En azul, las dobles positivas. Las células que aparecen marcadas en negro corresponden a células negativas para ambos fluoróforos.

IX. ENSAYOS DE MUERTE CELULAR

Se utilizó este tipo de ensayo para determinar el porcentaje de muerte celular generado tras el tratamiento de las células con el agente genotóxico doxorubicina.

Tras 24 horas de tratamiento continuo con doxorubicina se recogieron todas las células, tanto las células muertas “flotantes” como las vivas “adheridas”. De esta suspensión de células se cogieron 5 μ l a los que se añadieron 5 μ l del colorante Tripán Blue. Este volumen se depositó en las celdillas de la cámara *Neubauer* procediendo al conteo de las células. Para este conteo se diferenció entre células muertas, teñidas de azul, ya que el colorante penetra las membranas porosas de estas células, y células vivas, no teñidas. Los números obtenidos se multiplicaron por sus correspondientes factores de dilución para obtener el número de células muertas por muestra. El valor medio del porcentaje de muerte celular se obtuvo a partir del análisis de 3 valores independientes.

BIBLIOGRAFÍA

- Acquaviva, C., and J. Pines. 2006. The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C. *Journal of cell science*. 119:2401-2404.
- Allers, T., and M. Lichten. 2001. Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell*. 106:47-57.
- Amente, S., G. Napolitano, P. Licciardo, M. Monti, P. Pucci, L. Lania, and B. Majello. 2005. Identification of proteins interacting with the RNAPII FCP1 phosphatase: FCP1 forms a complex with arginine methyltransferase PRMT5 and it is a substrate for PRMT5-mediated methylation. *FEBS letters*. 579:683-689.
- Archambault, J., G. Pan, G.K. Dahmus, M. Cartier, N. Marshall, S. Zhang, M.E. Dahmus, and J. Greenblatt. 1998. FCP1, the RAP74-interacting subunit of a human protein phosphatase that dephosphorylates the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *The Journal of biological chemistry*. 273:27593-27601.
- Azzam, R., S.L. Chen, W. Shou, A.S. Mah, G. Alexandru, K. Nasmyth, R.S. Annan, S.A. Carr, and R.J. Deshaies. 2004. Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus. *Science*. 305:516-519.
- Baker, D.J., J. Chen, and J.M. van Deursen. 2005. The mitotic checkpoint in cancer and aging: what have mice taught us? *Current opinion in cell biology*. 17:583-589.
- Baker, D.J., K.B. Jeganathan, J.D. Cameron, M. Thompson, S. Juneja, A. Kopecka, R. Kumar, R.B. Jenkins, P.C. de Groen, P. Roche, and J.M. van Deursen. 2004. BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nature genetics*. 36:744-749.
- Bakkenist, C.J., and M.B. Kastan. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 421:499-506.
- Baldin, V., N. Theis-Febvre, C. Benne, C. Froment, M. Cazales, O. Bulet-Schiltz, and B. Ducommun. 2003. PKB/Akt phosphorylates the CDC25B phosphatase and regulates its intracellular localisation. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 95:547-554.
- Bartek, J., and J. Lukas. 2007. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Current opinion in cell biology*. 19:238-245.
- Bartkova, J., Z. Horejsi, K. Koed, A. Kramer, F. Tort, K. Zieger, P. Guldberg, M. Sehested, J.M. Nesland, C. Lukas, T. Orntoft, J. Lukas, and J. Bartek. 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*. 434:864-870.
- Bartkova, J., N. Rezaei, M. Liontos, P. Karakaidos, D. Kletsas, N. Issaeva, L.V. Vassiliou, E. Kolettas, K. Niforou, V.C. Zoumpourlis, M. Takaoka, H. Nakagawa, F. Tort, K. Fugger, F. Johansson, M. Sehested, C.L. Andersen, L. Dyrskjot, T. Orntoft, J. Lukas, C. Kittas, T. Helleday, T.D. Halazonetis, J. Bartek, and V.G. Gorgoulis. 2006. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 444:633-637.
- Bassermann, F., D. Frescas, D. Guardavaccaro, L. Busino, A. Peschiaroli, and M. Pagano. 2008. The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. *Cell*. 134:256-267.
- Bekker-Jensen, S., and N. Mailand. 2010. Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA repair*. 9:1219-1228.
- Bembenek, J., and H. Yu. 2001. Regulation of the anaphase-promoting complex by the dual specificity phosphatase human Cdc14a. *The Journal of biological chemistry*. 276:48237-48242.
- Bennetzen, M.V., D.H. Larsen, J. Bunkenborg, J. Bartek, J. Lukas, and J.S. Andersen. 2010. Site-specific phosphorylation dynamics of the nuclear proteome during the DNA damage response. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 9:1314-1323.
- Berdougo, E., M.V. Nachury, P.K. Jackson, and P.V. Jallepalli. 2008. The nucleolar phosphatase Cdc14B is dispensable for chromosome segregation and mitotic exit in human cells. *Cell cycle*. 7:1184-1190.

- Berman, D.B., J. Costalas, D.C. Schultz, G. Grana, M. Daly, and A.K. Godwin. 1996. A common mutation in BRCA2 that predisposes to a variety of cancers is found in both Jewish Ashkenazi and non-Jewish individuals. *Cancer research*. 56:3409-3414.
- Bertran, M.T., S. Sdelci, L. Regue, J. Avruch, C. Caelles, and J. Roig. 2011. Nek9 is a Plk1-activated kinase that controls early centrosome separation through Nek6/7 and Eg5. *The EMBO journal*. 30:2634-2647.
- Besson, A., S.F. Dowdy, and J.M. Roberts. 2008. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental cell*. 14:159-169.
- Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*. 7:1513-1523.
- Blanco, M.G., J. Matos, and S.C. West. 2014. Dual control of Yen1 nuclease activity and cellular localization by Cdk and Cdc14 prevents genome instability. *Molecular cell*. 54:94-106.
- Bolderson, E., N. Tomimatsu, D.J. Richard, D. Boucher, R. Kumar, T.K. Pandita, S. Burma, and K.K. Khanna. 2010. Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research*. 38:1821-1831.
- Bollen, M., D.W. Gerlich, and B. Lesage. 2009. Mitotic phosphatases: from entry guards to exit guides. *Trends in cell biology*. 19:531-541.
- Bollen, M., W. Peti, M.J. Ragusa, and M. Beullens. 2010. The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends in biochemical sciences*. 35:450-458.
- Boutros, R., C. Dozier, and B. Ducommun. 2006. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Current opinion in cell biology*. 18:185-191.
- Bremmer, S.C., H. Hall, J.S. Martinez, C.L. Eissler, T.H. Hinrichsen, S. Rossie, L.L. Parker, M.C. Hall, and H. Charbonneau. 2012. Cdc14 phosphatases preferentially dephosphorylate a subset of cyclin-dependent kinase (Cdk) sites containing phosphoserine. *The Journal of biological chemistry*. 287:1662-1669.
- Broadus, M.R., and K.L. Gould. 2012. Multiple protein kinases influence the redistribution of fission yeast Clp1/Cdc14 phosphatase upon genotoxic stress. *Molecular biology of the cell*. 23:4118-4128.
- Bulavin, D.V., C. Phillips, B. Nannenga, O. Timofeev, L.A. Donehower, C.W. Anderson, E. Appella, and A.J. Fornace, Jr. 2004. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nature genetics*. 36:343-350.
- Burgess, A., S. Vigneron, E. Brioudes, J.C. Labbe, T. Lorca, and A. Castro. 2010. Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:12564-12569.
- Caldecott, K.W. 2008. Single-strand break repair and genetic disease. *Nature reviews. Genetics*. 9:619-631.
- Carlton, J.G., A. Caballe, M. Agromayor, M. Kloc, and J. Martin-Serrano. 2012. ESCRT-III governs the Aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C. *Science*. 336:220-225.
- Castilho, P.V., B.C. Williams, S. Mochida, Y. Zhao, and M.L. Goldberg. 2009. The M phase kinase Greatwall (Gwl) promotes inactivation of PP2A/B55delta, a phosphatase directed against CDK phosphosites. *Molecular biology of the cell*. 20:4777-4789.
- Ceballos, S.J., and W.D. Heyer. 2011. Functions of the Snf2/Swi2 family Rad54 motor protein in homologous recombination. *Biochimica et biophysica acta*. 1809:509-523.
- Cejka, P., E. Cannavo, P. Polaczek, T. Masuda-Sasa, S. Pokharel, J.L. Campbell, and S.C. Kowalczykowski. 2010. DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature*. 467:112-116.
- Ciccio, A., and S.J. Elledge. 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell*. 40:179-204.
- Cimprich, K.A., and D. Cortez. 2008. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:616-627.

- Clemente-Blanco, A., M. Mayan-Santos, D.A. Schneider, F. Machin, A. Jarmuz, H. Tschochner, and L. Aragon. 2009. Cdc14 inhibits transcription by RNA polymerase I during anaphase. *Nature*. 458:219-222.
- Clemente-Blanco, A., N. Sen, M. Mayan-Santos, M.P. Sacristan, B. Graham, A. Jarmuz, A. Giess, E. Webb, L. Game, D. Eick, A. Bueno, M. Merckenschlager, and L. Aragon. 2011. Cdc14 phosphatase promotes segregation of telomeres through repression of RNA polymerase II transcription. *Nature cell biology*. 13:1450-1456.
- Cole, F., S. Keeney, and M. Jasin. 2010. Comprehensive, fine-scale dissection of homologous recombination outcomes at a hot spot in mouse meiosis. *Molecular cell*. 39:700-710.
- Collette, K.S., E.L. Petty, N. Golenberg, J.N. Bembenek, and G. Csankovszki. 2011. Different roles for Aurora B in condensin targeting during mitosis and meiosis. *Journal of cell science*. 124:3684-3694.
- Costanzo, V., D. Shechter, P.J. Lupardus, K.A. Cimprich, M. Gottesman, and J. Gautier. 2003. An ATR- and Cdc7-dependent DNA damage checkpoint that inhibits initiation of DNA replication. *Molecular cell*. 11:203-213.
- Cotta-Ramusino, C., E.R. McDonald, 3rd, K. Hurov, M.E. Sowa, J.W. Harper, and S.J. Elledge. 2011. A DNA damage response screen identifies RHINO, a 9-1-1 and TopBP1 interacting protein required for ATR signaling. *Science*. 332:1313-1317.
- Cueille, N., E. Salimova, V. Esteban, M. Blanco, S. Moreno, A. Bueno, and V. Simanis. 2001. Flp1, a fission yeast orthologue of the *S. cerevisiae* CDC14 gene, is not required for cyclin degradation or rum1p stabilisation at the end of mitosis. *Journal of cell science*. 114:2649-2664.
- Curtin, N.J. 2012. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature reviews. Cancer*. 12:801-817.
- Chang, C.J., S. Goulding, R.R. Adams, W.C. Earnshaw, and M. Carmena. 2006. Drosophila Incenp is required for cytokinesis and asymmetric cell division during development of the nervous system. *Journal of cell science*. 119:1144-1153.
- Chapman, J.R., and S.P. Jackson. 2008. Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. *EMBO reports*. 9:795-801.
- Chaudhuri, J., U. Basu, A. Zarrin, C. Yan, S. Franco, T. Perlot, B. Vuong, J. Wang, R.T. Phan, A. Datta, J. Manis, and F.W. Alt. 2007. Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Advances in immunology*. 94:157-214.
- Cheeseman, I.M., J.S. Chappie, E.M. Wilson-Kubalek, and A. Desai. 2006. The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell*. 127:983-997.
- Chen, J.S., L.X. Lu, M.D. Ohi, K.M. Creamer, C. English, J.F. Partridge, R. Ohi, and K.L. Gould. 2011a. Cdk1 phosphorylation of the kinetochore protein Nsk1 prevents error-prone chromosome segregation. *The Journal of cell biology*. 195:583-593.
- Chen, X., H. Niu, W.H. Chung, Z. Zhu, A. Papusha, E.Y. Shim, S.E. Lee, P. Sung, and G. Ira. 2011b. Cell cycle regulation of DNA double-strand break end resection by Cdk1-dependent Dna2 phosphorylation. *Nature structural & molecular biology*. 18:1015-1019.
- Cho, H.P., Y. Liu, M. Gomez, J. Dunlap, M. Tyers, and Y. Wang. 2005. The dual-specificity phosphatase CDC14B bundles and stabilizes microtubules. *Molecular and cellular biology*. 25:4541-4551.
- Choi, S.H., M.P. Peli-Gulli, I. McLeod, A. Sarkeshik, J.R. Yates, 3rd, V. Simanis, and D. McCollum. 2009. Phosphorylation state defines discrete roles for monopolin in chromosome attachment and spindle elongation. *Current biology : CB*. 19:985-995.
- Chowdhury, D., M.C. Keogh, H. Ishii, C.L. Peterson, S. Buratowski, and J. Lieberman. 2005. gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Molecular cell*. 20:801-809.

- Chowdhury, D., X. Xu, X. Zhong, F. Ahmed, J. Zhong, J. Liao, D.M. Dykxhoorn, D.M. Weinstock, G.P. Pfeifer, and J. Lieberman. 2008. A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. *Molecular cell*. 31:33-46.
- Chung, E., and R.H. Chen. 2003. Phosphorylation of Cdc20 is required for its inhibition by the spindle checkpoint. *Nature cell biology*. 5:748-753.
- D'Angiolella, V., C. Mari, D. Nocera, L. Rametti, and D. Grieco. 2003. The spindle checkpoint requires cyclin-dependent kinase activity. *Genes & development*. 17:2520-2525.
- Dai, C., and W. Gu. 2010. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends in molecular medicine*. 16:528-536.
- Dai, J., S. Sultan, S.S. Taylor, and J.M. Higgins. 2005. The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes & development*. 19:472-488.
- Dalal, S.N., C.M. Schweitzer, J. Gan, and J.A. DeCaprio. 1999. Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site. *Molecular and cellular biology*. 19:4465-4479.
- Dalvai, M., O. Mondesert, J.C. Bourdon, B. Ducommun, and C. Dozier. 2011. Cdc25B is negatively regulated by p53 through Sp1 and NF-Y transcription factors. *Oncogene*. 30:2282-2288.
- de Carcer, G., G. Manning, and M. Malumbres. 2011. From Plk1 to Plk5: functional evolution of polo-like kinases. *Cell cycle*. 10:2255-2262.
- De Souza, C.P., K.A. Ellem, and B.G. Gabrielli. 2000. Centrosomal and cytoplasmic Cdc2/cyclin B1 activation precedes nuclear mitotic events. *Experimental cell research*. 257:11-21.
- Deckbar, D., J. Birraux, A. Krempler, L. Tchouandong, A. Beucher, S. Walker, T. Stiff, P. Jeggo, and M. Lobrich. 2007. Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *The Journal of cell biology*. 176:749-755.
- Dekanty, A., L. Barrio, and M. Milan. 2014. Contributions of DNA repair, cell cycle checkpoints and cell death to suppressing the DNA damage-induced tumorigenic behavior of Drosophila epithelial cells. *Oncogene*.
- Dephoure, N., C. Zhou, J. Villen, S.A. Beausoleil, C.E. Bakalarski, S.J. Elledge, and S.P. Gygi. 2008. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:10762-10767.
- Diaz-Cuervo, H., and A. Bueno. 2008. Cds1 controls the release of Cdc14-like phosphatase Flp1 from the nucleolus to drive full activation of the checkpoint response to replication stress in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 19:2488-2499.
- Ditchfield, C., V.L. Johnson, A. Tighe, R. Ellston, C. Haworth, T. Johnson, A. Mortlock, N. Keen, and S.S. Taylor. 2003. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *The Journal of cell biology*. 161:267-280.
- Doil, C., N. Mailand, S. Bekker-Jensen, P. Menard, D.H. Larsen, R. Pepperkok, J. Ellenberg, S. Panier, D. Durocher, J. Bartek, J. Lukas, and C. Lukas. 2009. RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell*. 136:435-446.
- Donzelli, M., and G.F. Draetta. 2003. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO reports*. 4:671-677.
- Douglas, M.E., T. Davies, N. Joseph, and M. Mishima. 2010a. Aurora B and 14-3-3 coordinately regulate clustering of centralspindlin during cytokinesis. *Current biology : CB*. 20:927-933.
- Douglas, P., J. Zhong, R. Ye, G.B. Moorhead, X. Xu, and S.P. Lees-Miller. 2010b. Protein phosphatase 6 interacts with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and dephosphorylates gamma-H2AX. *Molecular and cellular biology*. 30:1368-1381.

- Dryden, S.C., F.A. Nahhas, J.E. Nowak, A.S. Goustin, and M.A. Tainsky. 2003. Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Molecular and cellular biology*. 23:3173-3185.
- Dutertre, S., M. Cazales, M. Quaranta, C. Froment, V. Trabut, C. Dozier, G. Mirey, J.P. Bouche, N. Theis-Febvre, E. Schmitt, B. Monsarrat, C. Prigent, and B. Ducommun. 2004. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *Journal of cell science*. 117:2523-2531.
- Eissler, C.L., G. Mazon, B.L. Powers, S.N. Savinov, L.S. Symington, and M.C. Hall. 2014. The Cdk/cDc14 module controls activation of the Yen1 holliday junction resolvase to promote genome stability. *Molecular cell*. 54:80-93.
- Elia, A.E., P. Rellos, L.F. Haire, J.W. Chao, F.J. Ivins, K. Hoepker, D. Mohammad, L.C. Cantley, S.J. Smerdon, and M.B. Yaffe. 2003. The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell*. 115:83-95.
- Enserink, J.M., H. Hombauer, M.E. Huang, and R.D. Kolodner. 2009. Cdc28/Cdk1 positively and negatively affects genome stability in *S. cerevisiae*. *The Journal of cell biology*. 185:423-437.
- Esashi, F., N. Christ, J. Gannon, Y. Liu, T. Hunt, M. Jasin, and S.C. West. 2005. CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature*. 434:598-604.
- Esashi, F., V.E. Galkin, X. Yu, E.H. Egelman, and S.C. West. 2007. Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2. *Nature structural & molecular biology*. 14:468-474.
- Esteban, V., M. Blanco, N. Cueille, V. Simanis, S. Moreno, and A. Bueno. 2004. A role for the Cdc14-family phosphatase Flp1p at the end of the cell cycle in controlling the rapid degradation of the mitotic inducer Cdc25p in fission yeast. *Journal of cell science*. 117:2461-2468.
- Esteban, V., M.D. Vazquez-Novelle, E. Calvo, A. Bueno, and M.P. Sacristan. 2006. Human Cdc14A reverses CDK1 phosphorylation of Cdc25A on serines 115 and 320. *Cell cycle*. 5:2894-2898.
- Falck, J., J. Coates, and S.P. Jackson. 2005. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*. 434:605-611.
- Falck, J., N. Mailand, R.G. Syljuasen, J. Bartek, and J. Lukas. 2001. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*. 410:842-847.
- Foe, I.T., S.A. Foster, S.K. Cheung, S.Z. DeLuca, D.O. Morgan, and D.P. Toczyski. 2011. Ubiquitination of Cdc20 by the APC occurs through an intramolecular mechanism. *Current biology : CB*. 21:1870-1877.
- Foley, E.A., and T.M. Kapoor. 2013. Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 14:25-37.
- Forester, C.M., J. Maddox, J.V. Louis, J. Goris, and D.M. Virshup. 2007. Control of mitotic exit by PP2A regulation of Cdc25C and Cdk1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:19867-19872.
- Forrest, A., and B. Gabrielli. 2001. Cdc25B activity is regulated by 14-3-3. *Oncogene*. 20:4393-4401.
- Freeman, A.K., and A.N. Monteiro. 2010. Phosphatases in the cellular response to DNA damage. *Cell communication and signaling : CCS*. 8:27.
- Fu, J., M. Bian, Q. Jiang, and C. Zhang. 2007. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Molecular cancer research : MCR*. 5:1-10.
- Funabiki, H., and D.J. Wynne. 2013. Making an effective switch at the kinetochore by phosphorylation and dephosphorylation. *Chromosoma*. 122:135-158.
- Galanty, Y., R. Belotserkovskaya, J. Coates, S. Polo, K.M. Miller, and S.P. Jackson. 2009. Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature*. 462:935-939.

- Geuting, V., C. Reul, and M. Lobrich. 2013. ATM release at resected double-strand breaks provides heterochromatin reconstitution to facilitate homologous recombination. *PLoS genetics*. 9:e1003667.
- Gharbi-Ayachi, A., J.C. Labbe, A. Burgess, S. Vigneron, J.M. Strub, E. Brioude, A. Van-Dorselaer, A. Castro, and T. Lorca. 2010. The substrate of Greatwall kinase, Arpp19, controls mitosis by inhibiting protein phosphatase 2A. *Science*. 330:1673-1677.
- Glover, D.M. 2012. The overlooked greatwall: a new perspective on mitotic control. *Open biology*. 2:120023.
- Gong, D., J.R. Pomeroy, J.W. Myers, C. Gustavsson, J.T. Jones, A.T. Hahn, T. Meyer, and J.E. Ferrell, Jr. 2007. Cyclin A2 regulates nuclear-envelope breakdown and the nuclear accumulation of cyclin B1. *Current biology : CB*. 17:85-91.
- Gorgoulis, V.G., L.V. Vassiliou, P. Karakaidos, P. Zacharatos, A. Kotsinas, T. Liloglou, M. Venere, R.A. Dittullo, Jr., N.G. Kastrinakis, B. Levy, D. Kletsas, A. Yoneta, M. Herlyn, C. Kittas, and T.D. Halazonetis. 2005. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*. 434:907-913.
- Goto, H., T. Kiyono, Y. Tomono, A. Kawajiri, T. Urano, K. Furukawa, E.A. Nigg, and M. Inagaki. 2006. Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition. *Nature cell biology*. 8:180-187.
- Grallert, A., E. Boke, A. Hagting, B. Hodgson, Y. Connolly, J.R. Griffiths, D.L. Smith, J. Pines, and I.M. Hagan. 2014. A PP1-PP2A phosphatase relay controls mitotic progression. *Nature*.
- Gray, C.H., V.M. Good, N.K. Tonks, and D. Barford. 2003. The structure of the cell cycle protein Cdc14 reveals a proline-directed protein phosphatase. *The EMBO journal*. 22:3524-3535.
- Gruneberg, U., R. Neef, R. Honda, E.A. Nigg, and F.A. Barr. 2004. Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. *The Journal of cell biology*. 166:167-172.
- Guillamot, M., E. Machado, M. Chiesa, G. Gomez-Lopez, D.G. Pisano, M.P. Sacristan, and M. Malumbres. 2011. Cdc14b regulates mammalian RNA polymerase II and represses cell cycle transcription. *Scientific reports*. 1:189.
- Hagting, A., C. Karlsson, P. Clute, M. Jackman, and J. Pines. 1998. MPF localization is controlled by nuclear export. *The EMBO journal*. 17:4127-4138.
- Hamilton, J., A.M. Grawenda, and E.J. Bernhard. 2009. Phosphatase inhibition and cell survival after DNA damage induced by radiation. *Cancer biology & therapy*. 8:1577-1586.
- Hanks, S., K. Coleman, S. Reid, A. Plaja, H. Firth, D. Fitzpatrick, A. Kidd, K. Mehes, R. Nash, N. Robin, N. Shannon, J. Tolmie, J. Swansbury, A. Irrthum, J. Douglas, and N. Rahman. 2004. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nature genetics*. 36:1159-1161.
- Hansen, C.A., J. Bartek, and S. Jensen. 2008. A functional link between the human cell cycle-regulatory phosphatase Cdc14A and the atypical mitogen-activated kinase Erk3. *Cell cycle*. 7:325-334.
- Hegarath, N., C. Vesely, P.K. Vinod, C. Ocasio, N. Peter, J. Gannon, A.W. Oliver, B. Novak, and H. Hochegger. 2014. PP2A/B55 and Fcp1 regulate Greatwall and Ensa dephosphorylation during mitotic exit. *PLoS genetics*. 10:e1004004.
- Herzog, F., K. Mechtler, and J.M. Peters. 2005. Identification of cell cycle-dependent phosphorylation sites on the anaphase-promoting complex/cyclosome by mass spectrometry. *Methods in enzymology*. 398:231-245.
- Hewitt, L., A. Tighe, S. Santaguida, A.M. White, C.D. Jones, A. Musacchio, S. Green, and S.S. Taylor. 2010. Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex. *The Journal of cell biology*. 190:25-34.
- Hoeijmakers, J.H. 2009. DNA damage, aging, and cancer. *The New England journal of medicine*. 361:1475-1485.

- Hua, S., Z. Wang, K. Jiang, Y. Huang, T. Ward, L. Zhao, Z. Dou, and X. Yao. 2011. CENP-U cooperates with Hec1 to orchestrate kinetochore-microtubule attachment. *The Journal of biological chemistry*. 286:1627-1638.
- Huen, M.S., R. Grant, I. Manke, K. Minn, X. Yu, M.B. Yaffe, and J. Chen. 2007. RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell*. 131:901-914.
- Huertas, P., and S.P. Jackson. 2009. Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *The Journal of biological chemistry*. 284:9558-9565.
- Hummer, S., and T.U. Mayer. 2009. Cdk1 negatively regulates midzone localization of the mitotic kinesin Mklp2 and the chromosomal passenger complex. *Current biology : CB*. 19:607-612.
- Inoue, T., M. Hiratsuka, M. Osaki, H. Yamada, I. Kishimoto, S. Yamaguchi, S. Nakano, M. Katoh, H. Ito, and M. Oshimura. 2007. SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. *Oncogene*. 26:945-957.
- Ira, G., A. Pellicoli, A. Balijja, X. Wang, S. Fiorani, W. Carotenuto, G. Liberi, D. Bressan, L. Wan, N.M. Hollingsworth, J.E. Haber, and M. Foiani. 2004. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature*. 431:1011-1017.
- Jackman, M., C. Lindon, E.A. Nigg, and J. Pines. 2003. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nature cell biology*. 5:143-148.
- Jazaeri, A.A., C.J. Yee, C. Sotiriou, K.R. Brantley, J. Boyd, and E.T. Liu. 2002. Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA2-linked, and sporadic ovarian cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 94:990-1000.
- Jazayeri, A., J. Falck, C. Lukas, J. Bartek, G.C. Smith, J. Lukas, and S.P. Jackson. 2006. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nature cell biology*. 8:37-45.
- Jeganathan, K., L. Malureanu, D.J. Baker, S.C. Abraham, and J.M. van Deursen. 2007. Bub1 mediates cell death in response to chromosome missegregation and acts to suppress spontaneous tumorigenesis. *The Journal of cell biology*. 179:255-267.
- Jeong, A.L., and Y. Yang. 2013. PP2A function toward mitotic kinases and substrates during the cell cycle. *BMB reports*. 46:289-294.
- Ji, M., S. Yang, Y. Chen, L. Xiao, L. Zhang, and J. Dong. 2012. Phospho-regulation of KIBRA by CDK1 and CDC14 phosphatase controls cell-cycle progression. *The Biochemical journal*. 447:93-102.
- Jin, J., X.L. Ang, X. Ye, M. Livingstone, and J.W. Harper. 2008. Differential roles for checkpoint kinases in DNA damage-dependent degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *The Journal of biological chemistry*. 283:19322-19328.
- Johnson, V.L., M.I. Scott, S.V. Holt, D. Hussein, and S.S. Taylor. 2004. Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. *Journal of cell science*. 117:1577-1589.
- Kaiser, B.K., Z.A. Zimmerman, H. Charbonneau, and P.K. Jackson. 2002. Disruption of centrosome structure, chromosome segregation, and cytokinesis by misexpression of human Cdc14A phosphatase. *Molecular biology of the cell*. 13:2289-2300.
- Kalakonda, N., W. Fischle, P. Boccuni, N. Gurvich, R. Hoya-Arias, X. Zhao, Y. Miyata, D. Macgrogan, J. Zhang, J.K. Sims, J.C. Rice, and S.D. Nimer. 2008. Histone H4 lysine 20 monomethylation promotes transcriptional repression by L3MBTL1. *Oncogene*. 27:4293-4304.
- Karess, R. 2005. Rod-Zw10-Zwilch: a key player in the spindle checkpoint. *Trends in cell biology*. 15:386-392.

- Kasahara, K., H. Goto, M. Enomoto, Y. Tomono, T. Kiyono, and M. Inagaki. 2010. 14-3-3gamma mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. *The EMBO journal*. 29:2802-2812.
- Kastan, M.B., and J. Bartek. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 432:316-323.
- Kasuboski, J.M., J.R. Bader, P.S. Vaughan, S.B. Tauhata, M. Winding, M.A. Morrissey, M.V. Joyce, W. Boggess, L. Vos, G.K. Chan, E.H. Hinchcliffe, and K.T. Vaughan. 2011. Zwint-1 is a novel Aurora B substrate required for the assembly of a dynein-binding platform on kinetochores. *Molecular biology of the cell*. 22:3318-3330.
- Kawashima, S.A., T. Tsukahara, M. Langeegger, S. Hauf, T.S. Kitajima, and Y. Watanabe. 2007. Shugoshin enables tension-generating attachment of kinetochores by loading Aurora to centromeres. *Genes & development*. 21:420-435.
- Kawashima, S.A., Y. Yamagishi, T. Honda, K. Ishiguro, and Y. Watanabe. 2010. Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science*. 327:172-177.
- Keogh, M.C., J.A. Kim, M. Downey, J. Fillingham, D. Chowdhury, J.C. Harrison, M. Onishi, N. Datta, S. Galicia, A. Emili, J. Lieberman, X. Shen, S. Buratowski, J.E. Haber, D. Durocher, J.F. Greenblatt, and N.J. Krogan. 2006. A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature*. 439:497-501.
- Khmelinskii, A., C. Lawrence, J. Roostalu, and E. Schiebel. 2007. Cdc14-regulated midzone assembly controls anaphase B. *The Journal of cell biology*. 177:981-993.
- Kim, N.G., Y.R. Choi, M.J. Baek, Y.H. Kim, H. Kang, N.K. Kim, J.S. Min, and H. Kim. 2001. Frameshift mutations at coding mononucleotide repeats of the hRAD50 gene in gastrointestinal carcinomas with microsatellite instability. *Cancer research*. 61:36-38.
- Kobayashi, H., E. Stewart, R. Poon, J.P. Adamczewski, J. Gannon, and T. Hunt. 1992. Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Molecular biology of the cell*. 3:1279-1294.
- Kops, G.J., B.A. Weaver, and D.W. Cleveland. 2005. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature reviews. Cancer*. 5:773-785.
- Kozlov, S.V., M.E. Graham, C. Peng, P. Chen, P.J. Robinson, and M.F. Lavin. 2006. Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *The EMBO journal*. 25:3504-3514.
- Krajewska, M., A.M. Heijink, Y.J. Bisselink, R.I. Seinstra, H.H. Sillje, E.G. de Vries, and M.A. van Vugt. 2013. Forced activation of Cdk1 via wee1 inhibition impairs homologous recombination. *Oncogene*. 32:3001-3008.
- Krejci, L., V. Altmannova, M. Spirek, and X. Zhao. 2012. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic acids research*. 40:5795-5818.
- Krogh, B.O., and L.S. Symington. 2004. Recombination proteins in yeast. *Annual review of genetics*. 38:233-271.
- Kuilman, T., A. Maiolica, M. Godfrey, N. Scheidel, R. Aebbersold, and F. Uhlmann. 2014. Identification of Cdk targets that control cytokinesis. *The EMBO journal*.
- Labit, H., K. Fujimitsu, N.S. Bayin, T. Takaki, J. Gannon, and H. Yamano. 2012. Dephosphorylation of Cdc20 is required for its C-box-dependent activation of the APC/C. *The EMBO journal*. 31:3351-3362.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lampson, M.A., and I.M. Cheeseman. 2011. Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends in cell biology*. 21:133-140.
- Landsverk, H.B., M. Kirkhus, M. Bollen, T. Kuntziger, and P. Collas. 2005. PNUTS enhances in vitro chromosome decondensation in a PP1-dependent manner. *The Biochemical journal*. 390:709-717.

- Lanzetti, L., V. Margaria, F. Melander, L. Virgili, M.H. Lee, J. Bartek, and S. Jensen. 2007. Regulation of the Rab5 GTPase-activating protein RN-tre by the dual specificity phosphatase Cdc14A in human cells. *The Journal of biological chemistry*. 282:15258-15270.
- Lavin, M.F. 2008. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:759-769.
- Lee, D.H., and D. Chowdhury. 2011. What goes on must come off: phosphatases gate-crash the DNA damage response. *Trends in biochemical sciences*. 36:569-577.
- Lee, D.H., Y. Pan, S. Kanner, P. Sung, J.A. Borowiec, and D. Chowdhury. 2010. A PP4 phosphatase complex dephosphorylates RPA2 to facilitate DNA repair via homologous recombination. *Nature structural & molecular biology*. 17:365-372.
- Lee, M.N., R.C. Tseng, H.S. Hsu, J.Y. Chen, C. Tzao, W.L. Ho, and Y.C. Wang. 2007. Epigenetic inactivation of the chromosomal stability control genes BRCA1, BRCA2, and XRCC5 in non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 13:832-838.
- Lees, E. 1995. Cyclin dependent kinase regulation. *Current opinion in cell biology*. 7:773-780.
- Lees, E.M., and E. Harlow. 1993. Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Molecular and cellular biology*. 13:1194-1201.
- Lens, S.M., J.A. Rodriguez, G. Vader, S.W. Span, G. Giaccone, and R.H. Medema. 2006. Uncoupling the central spindle-associated function of the chromosomal passenger complex from its role at centromeres. *Molecular biology of the cell*. 17:1897-1909.
- Li, L., M. Ljungman, and J.E. Dixon. 2000. The human Cdc14 phosphatases interact with and dephosphorylate the tumor suppressor protein p53. *The Journal of biological chemistry*. 275:2410-2414.
- Lieber, M.R., J. Gu, H. Lu, N. Shimazaki, and A.G. Tsai. 2010. Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. *Sub-cellular biochemistry*. 50:279-296.
- Lieber, M.R., Y. Ma, U. Pannicke, and K. Schwarz. 2003. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 4:712-720.
- Lin, Y.T., Y. Chen, G. Wu, and W.H. Lee. 2006. Hec1 sequentially recruits Zwint-1 and ZW10 to kinetochores for faithful chromosome segregation and spindle checkpoint control. *Oncogene*. 25:6901-6914.
- Lindqvist, A., H. Kallstrom, A. Lundgren, E. Barsoum, and C.K. Rosenthal. 2005. Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. *The Journal of cell biology*. 171:35-45.
- Lindqvist, A., V. Rodriguez-Bravo, and R.H. Medema. 2009. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *The Journal of cell biology*. 185:193-202.
- Liu, D., M. Vleugel, C.B. Backer, T. Hori, T. Fukagawa, I.M. Cheeseman, and M.A. Lampson. 2010a. Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by KNL1 opposes Aurora B kinase. *The Journal of cell biology*. 188:809-820.
- Liu, F., J.J. Stanton, Z. Wu, and H. Piwnicka-Worms. 1997. The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Molecular and cellular biology*. 17:571-583.
- Liu, S., S. Bekker-Jensen, N. Mailand, C. Lukas, J. Bartek, and J. Lukas. 2006. Claspin operates downstream of TopBP1 to direct ATR signaling towards Chk1 activation. *Molecular and cellular biology*. 26:6056-6064.
- Liu, X.S., H. Li, B. Song, and X. Liu. 2010b. Polo-like kinase 1 phosphorylation of G2 and S-phase-expressed 1 protein is essential for p53 inactivation during G2 checkpoint recovery. *EMBO reports*. 11:626-632.

- Liu, Y., M. Tarsounas, P. O'Regan, and S.C. West. 2007. Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair. *The Journal of biological chemistry*. 282:1973-1979.
- Lolli, G., and L.N. Johnson. 2005. CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell cycle*. 4:572-577.
- Lou, Z., K. Minter-Dykhouse, S. Franco, M. Gostissa, M.A. Rivera, A. Celeste, J.P. Manis, J. van Deursen, A. Nussenzweig, T.T. Paull, F.W. Alt, and J. Chen. 2006. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Molecular cell*. 21:187-200.
- Lu, J., J.S. Kovach, F. Johnson, J. Chiang, R. Hodes, R. Lonser, and Z. Zhuang. 2009. Inhibition of serine/threonine phosphatase PP2A enhances cancer chemotherapy by blocking DNA damage induced defense mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:11697-11702.
- Maciejowski, J., K.A. George, M.E. Terret, C. Zhang, K.M. Shokat, and P.V. Jallepalli. 2010. Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling. *The Journal of cell biology*. 190:89-100.
- Macurek, L., A. Lindqvist, O. Voets, J. Kool, H.R. Vos, and R.H. Medema. 2010. Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gammaH2AX to promote checkpoint inhibition. *Oncogene*. 29:2281-2291.
- Magidson, V., C.B. O'Connell, J. Loncarek, R. Paul, A. Mogilner, and A. Khodjakov. 2011. The spatial arrangement of chromosomes during prometaphase facilitates spindle assembly. *Cell*. 146:555-567.
- Mahaney, B.L., K. Meek, and S.P. Lees-Miller. 2009. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *The Biochemical journal*. 417:639-650.
- Mailand, N., S. Bekker-Jensen, J. Bartek, and J. Lukas. 2006. Destruction of Claspin by SCFbetaTrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *Molecular cell*. 23:307-318.
- Mailand, N., S. Bekker-Jensen, H. Faustrup, F. Melander, J. Bartek, C. Lukas, and J. Lukas. 2007. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell*. 131:887-900.
- Mailand, N., J. Falck, C. Lukas, R.G. Syljuasen, M. Welcker, J. Bartek, and J. Lukas. 2000. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science*. 288:1425-1429.
- Mailand, N., C. Lukas, B.K. Kaiser, P.K. Jackson, J. Bartek, and J. Lukas. 2002a. Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation. *Nature cell biology*. 4:317-322.
- Mailand, N., A.V. Podtelejnikov, A. Groth, M. Mann, J. Bartek, and J. Lukas. 2002b. Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *The EMBO journal*. 21:5911-5920.
- Malkova, A., E.L. Ivanov, and J.E. Haber. 1996. Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:7131-7136.
- Malumbres, M., and M. Barbacid. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences*. 30:630-641.
- Malumbres, M., and M. Barbacid. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews. Cancer*. 9:153-166.
- Manchado, E., M. Guillamot, G. de Carcer, M. Eguren, M. Trickey, I. Garcia-Higuera, S. Moreno, H. Yamano, M. Canamero, and M. Malumbres. 2010. Targeting mitotic exit leads to tumor regression in vivo: Modulation by Cdk1, Mastl, and the PP2A/B55alpha,delta phosphatase. *Cancer cell*. 18:641-654.

- Mansfeld, J., P. Collin, M.O. Collins, J.S. Choudhary, and J. Pines. 2011. APC15 drives the turnover of MCC-CDC20 to make the spindle assembly checkpoint responsive to kinetochore attachment. *Nature cell biology*. 13:1234-1243.
- Mantel, C., Y. Guo, M.R. Lee, M.K. Kim, M.K. Han, H. Shibayama, S. Fukuda, M.C. Yoder, L.M. Pelus, K.S. Kim, and H.E. Broxmeyer. 2007. Checkpoint-apoptosis uncoupling in human and mouse embryonic stem cells: a source of karyotypic instability. *Blood*. 109:4518-4527.
- Mao, Y., A. Desai, and D.W. Cleveland. 2005. Microtubule capture by CENP-E silences BubR1-dependent mitotic checkpoint signaling. *The Journal of cell biology*. 170:873-880.
- Maresca, T.J., and E.D. Salmon. 2009. Intrakinetochore stretch is associated with changes in kinetochore phosphorylation and spindle assembly checkpoint activity. *The Journal of cell biology*. 184:373-381.
- Marsit, C.J., M. Liu, H.H. Nelson, M. Posner, M. Suzuki, and K.T. Kelsey. 2004. Inactivation of the Fanconi anemia/BRCA pathway in lung and oral cancers: implications for treatment and survival. *Oncogene*. 23:1000-1004.
- McClendon, A.K., and N. Osheroff. 2007. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutation research*. 623:83-97.
- McKenzie, L., S. King, L. Marcar, S. Nicol, S.S. Dias, K. Schumm, P. Robertson, J.C. Bourdon, N. Perkins, F. Fuller-Pace, and D.W. Meek. 2010. p53-dependent repression of polo-like kinase-1 (PLK1). *Cell cycle*. 9:4200-4212.
- Medema, R.H., and L. Macurek. 2012. Checkpoint control and cancer. *Oncogene*. 31:2601-2613.
- Melixetian, M., D.K. Klein, C.S. Sorensen, and K. Helin. 2009. NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint. *Nature cell biology*. 11:1247-1253.
- Meyer, B., K.O. Voss, F. Tobias, B. Jakob, M. Durante, and G. Taucher-Scholz. 2013. Clustered DNA damage induces pan-nuclear H2AX phosphorylation mediated by ATM and DNA-PK. *Nucleic acids research*. 41:6109-6118.
- Michel, L.S., V. Liberal, A. Chatterjee, R. Kirchwegger, B. Pasche, W. Gerald, M. Dobles, P.K. Sorger, V.V. Murty, and R. Benezra. 2001. MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature*. 409:355-359.
- Mirchenko, L., and F. Uhlmann. 2010. Sli15(INCENP) dephosphorylation prevents mitotic checkpoint reengagement due to loss of tension at anaphase onset. *Current biology : CB*. 20:1396-1401.
- Mishra, M., J. Karagiannis, M. Sevugan, P. Singh, and M.K. Balasubramanian. 2005. The 14-3-3 protein rad24p modulates function of the cdc14p family phosphatase clp1p/flp1p in fission yeast. *Current biology : CB*. 15:1376-1383.
- Mocciaro, A., E. Berdougo, K. Zeng, E. Black, P. Vagnarelli, W. Earnshaw, D. Gillespie, P. Jallepalli, and E. Schiebel. 2010. Vertebrate cells genetically deficient for Cdc14A or Cdc14B retain DNA damage checkpoint proficiency but are impaired in DNA repair. *The Journal of cell biology*. 189:631-639.
- Mocciaro, A., and E. Schiebel. 2010. Cdc14: a highly conserved family of phosphatases with non-conserved functions? *Journal of cell science*. 123:2867-2876.
- Mochida, S., S. Ikeo, J. Gannon, and T. Hunt. 2009. Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in *Xenopus* egg extracts. *The EMBO journal*. 28:2777-2785.
- Mohindra, A., L.E. Hays, E.N. Phillips, B.D. Preston, T. Helleday, and M. Meuth. 2002. Defects in homologous recombination repair in mismatch-repair-deficient tumour cell lines. *Human molecular genetics*. 11:2189-2200.
- Mohl, D.A., M.J. Huddleston, T.S. Collingwood, R.S. Annan, and R.J. Deshaies. 2009. Dbf2-Mob1 drives relocalization of protein phosphatase Cdc14 to the cytoplasm during exit from mitosis. *The Journal of cell biology*. 184:527-539.

- Monier, K., S. Mouradian, and K.F. Sullivan. 2007. DNA methylation promotes Aurora-B-driven phosphorylation of histone H3 in chromosomal subdomains. *Journal of cell science*. 120:101-114.
- Moon, S.H., L. Lin, X. Zhang, T.A. Nguyen, Y. Darlington, A.S. Waldman, X. Lu, and L.A. Donehower. 2010. Wild-type p53-induced phosphatase 1 dephosphorylates histone variant gamma-H2AX and suppresses DNA double strand break repair. *The Journal of biological chemistry*. 285:12935-12947.
- Morgan, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature*. 374:131-134.
- Mori, D., Y. Yano, K. Toyo-oka, N. Yoshida, M. Yamada, M. Muramatsu, D. Zhang, H. Saya, Y.Y. Toyoshima, K. Kinoshita, A. Wynshaw-Boris, and S. Hirotsune. 2007. NDEL1 phosphorylation by Aurora-A kinase is essential for centrosomal maturation, separation, and TACC3 recruitment. *Molecular and cellular biology*. 27:352-367.
- Morris, J.R., C. Boutell, M. Keppler, R. Densham, D. Weekes, A. Alamshah, L. Butler, Y. Galanty, L. Pangon, T. Kiuchi, T. Ng, and E. Solomon. 2009. The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature*. 462:886-890.
- Mueller, P.R., T.R. Coleman, A. Kumagai, and W.G. Dunphy. 1995. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science*. 270:86-90.
- Musacchio, A., and E.D. Salmon. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 8:379-393.
- Nakada, S., G.I. Chen, A.C. Gingras, and D. Durocher. 2008. PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO reports*. 9:1019-1026.
- Nakajima, H., F. Toyoshima-Morimoto, E. Taniguchi, and E. Nishida. 2003. Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *The Journal of biological chemistry*. 278:25277-25280.
- Nalepa, G., and J.W. Harper. 2004. Visualization of a highly organized intranuclear network of filaments in living mammalian cells. *Cell motility and the cytoskeleton*. 59:94-108.
- Nazarov, I.B., A.N. Smirnova, R.I. Krutilina, M.P. Svetlova, L.V. Solovjeva, A.A. Nikiforov, S.L. Oei, I.A. Zalenskaya, P.M. Yau, E.M. Bradbury, and N.V. Tomilin. 2003. Dephosphorylation of histone gamma-H2AX during repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells and its inhibition by calyculin A. *Radiation research*. 160:309-317.
- Nicassio, F., N. Corrado, J.H. Vissers, L.B. Areces, S. Bergink, J.A. Marteijn, B. Geverts, A.B. Houtsmuller, W. Vermeulen, P.P. Di Fiore, and E. Citterio. 2007. Human USP3 is a chromatin modifier required for S phase progression and genome stability. *Current biology : CB*. 17:1972-1977.
- Nigg, E.A. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:21-32.
- North, B.J., and E. Verdin. 2007a. Interphase nucleo-cytoplasmic shuttling and localization of SIRT2 during mitosis. *PLoS one*. 2:e784.
- North, B.J., and E. Verdin. 2007b. Mitotic regulation of SIRT2 by cyclin-dependent kinase 1-dependent phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 282:19546-19555.
- O'Regan, L., J. Blot, and A.M. Fry. 2007. Mitotic regulation by NIMA-related kinases. *Cell division*. 2:25.
- Oliveira, R.A., and K. Nasmyth. 2010. Getting through anaphase: splitting the sisters and beyond. *Biochemical Society transactions*. 38:1639-1644.
- Osmani, S.A., and X.S. Ye. 1996. Cell cycle regulation in *Aspergillus* by two protein kinases. *The Biochemical journal*. 317 (Pt 3):633-641.
- Ovejero, S., P. Ayala, A. Bueno, and M.P. Sacristan. 2012. Human Cdc14A regulates Wee1 stability by counteracting CDK-mediated phosphorylation. *Molecular biology of the cell*. 23:4515-4525.
- Passmore, L.A. 2004. The anaphase-promoting complex (APC): the sum of its parts? *Biochemical Society transactions*. 32:724-727.

- Paulsen, M.T., A.M. Starks, F.A. Derheimer, S. Hanasoge, L. Li, J.E. Dixon, and M. Ljungman. 2006. The p53-targeting human phosphatase hCdc14A interacts with the Cdk1/cyclin B complex and is differentially expressed in human cancers. *Molecular cancer*. 5:25.
- Peddibhotla, S., Z. Wei, R. Papineni, M.H. Lam, J.M. Rosen, and P. Zhang. 2011. The DNA damage effector Chk1 kinase regulates Cdc14B nucleolar shuttling during cell cycle progression. *Cell cycle*. 10:671-679.
- Pereira, G., and E. Schiebel. 2003. Separase regulates INCENP-Aurora B anaphase spindle function through Cdc14. *Science*. 302:2120-2124.
- Petermann, E., M.L. Orta, N. Issaeva, N. Schultz, and T. Helleday. 2010. Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Molecular cell*. 37:492-502.
- Peters, J.M. 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 7:644-656.
- Petronczki, M., P. Lenart, and J.M. Peters. 2008. Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Developmental cell*. 14:646-659.
- Petrovic, A., S. Pasqualato, P. Dube, V. Krenn, S. Santaguida, D. Cittaro, S. Monzani, L. Massimiliano, J. Keller, A. Tarricone, A. Maiolica, H. Stark, and A. Musacchio. 2010. The MIS12 complex is a protein interaction hub for outer kinetochore assembly. *The Journal of cell biology*. 190:835-852.
- Pines, J. 2011. Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 12:427-438.
- Pines, J., and C.L. Rieder. 2001. Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nature cell biology*. 3:E3-6.
- Pinsky, B.A., C. Kung, K.M. Shokat, and S. Biggins. 2006. The Ipl1-Aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores. *Nature cell biology*. 8:78-83.
- Potapova, T.A., S. Sivakumar, J.N. Flynn, R. Li, and G.J. Gorbsky. 2011. Mitotic progression becomes irreversible in prometaphase and collapses when Wee1 and Cdc25 are inhibited. *Molecular biology of the cell*. 22:1191-1206.
- Prevost, M., D. Chamousset, I. Nasa, E. Freele, N. Morrice, G. Moorhead, and L. Trinkle-Mulcahy. 2013. Quantitative fragmentome mapping reveals novel, domain-specific partners for the modular protein RepoMan (recruits PP1 onto mitotic chromatin at anaphase). *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 12:1468-1486.
- Qian, J., M. Beullens, B. Lesage, and M. Bollen. 2013. Aurora B defines its own chromosomal targeting by opposing the recruitment of the phosphatase scaffold Repo-Man. *Current biology : CB*. 23:1136-1143.
- Qian, J., B. Lesage, M. Beullens, A. Van Eynde, and M. Bollen. 2011. PP1/Repo-man dephosphorylates mitotic histone H3 at T3 and regulates chromosomal aurora B targeting. *Current biology : CB*. 21:766-773.
- Queralt, E., and F. Uhlmann. 2008. Separase cooperates with Zds1 and Zds2 to activate Cdc14 phosphatase in early anaphase. *The Journal of cell biology*. 182:873-883.
- Reed, S.I., J. Ferguson, and J.C. Groppe. 1982. Preliminary characterization of the transcriptional and translational products of the *Saccharomyces cerevisiae* cell division cycle gene CDC28. *Molecular and cellular biology*. 2:412-425.
- Reed, S.I., J.A. Hadwiger, and A.T. Lorincz. 1985. Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene CDC28. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82:4055-4059.
- Reinhardt, H.C., P. Hasskamp, I. Schmedding, S. Morandell, M.A. van Vugt, X. Wang, R. Linding, S.E. Ong, D. Weaver, S.A. Carr, and M.B. Yaffe. 2010. DNA damage activates a spatially distinct late cytoplasmic cell-cycle checkpoint network controlled by MK2-mediated RNA stabilization. *Molecular cell*. 40:34-49.

- Reinhardt, H.C., and M.B. Yaffe. 2009. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Current opinion in cell biology*. 21:245-255.
- Rodier, G., P. Coulombe, P.L. Tanguay, C. Boutonnet, and S. Meloche. 2008. Phosphorylation of Skp2 regulated by CDK2 and Cdc14B protects it from degradation by APC(Cdh1) in G1 phase. *The EMBO journal*. 27:679-691.
- Rosso, L., A.C. Marques, M. Weier, N. Lambert, M.A. Lambot, P. Vanderhaeghen, and H. Kaessmann. 2008. Birth and rapid subcellular adaptation of a hominoid-specific CDC14 protein. *PLoS biology*. 6:e140.
- Rothblum-Oviatt, C.J., C.E. Ryan, and H. Piwnica-Worms. 2001. 14-3-3 binding regulates catalytic activity of human Wee1 kinase. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 12:581-589.
- Ruchaud, S., M. Carmena, and W.C. Earnshaw. 2007. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 8:798-812.
- Saito-Ohara, F., I. Imoto, J. Inoue, H. Hosoi, A. Nakagawara, T. Sugimoto, and J. Inazawa. 2003. PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma. *Cancer research*. 63:1876-1883.
- Santamaria, D., C. Barriere, A. Cerqueira, S. Hunt, C. Tardy, K. Newton, J.F. Caceres, P. Dubus, M. Malumbres, and M. Barbacid. 2007. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*. 448:811-815.
- Saurin, A.T., M.S. van der Waal, R.H. Medema, S.M. Lens, and G.J. Kops. 2011. Aurora B potentiates Mps1 activation to ensure rapid checkpoint establishment at the onset of mitosis. *Nature communications*. 2:316.
- Screpanti, E., A. De Antoni, G.M. Alushin, A. Petrovic, T. Melis, E. Nogales, and A. Musacchio. 2011. Direct binding of Cenp-C to the Mis12 complex joins the inner and outer kinetochore. *Current biology : CB*. 21:391-398.
- Schmitz, M.H., M. Held, V. Janssens, J.R. Hutchins, O. Hudecz, E. Ivanova, J. Goris, L. Trinkle-Mulcahy, A.I. Lamond, I. Poser, A.A. Hyman, K. Mechtler, J.M. Peters, and D.W. Gerlich. 2010. Live-cell imaging RNAi screen identifies PP2A-B55alpha and importin-beta1 as key mitotic exit regulators in human cells. *Nature cell biology*. 12:886-893.
- Sdelci, S., M. Schutz, R. Pinyol, M.T. Bertran, L. Regue, C. Caelles, I. Vernos, and J. Roig. 2012. Nek9 phosphorylation of NEDD1/GCP-WD contributes to Plk1 control of gamma-tubulin recruitment to the mitotic centrosome. *Current biology : CB*. 22:1516-1523.
- Shaltiel, I.A., M. Aprelia, A.T. Saurin, D. Chowdhury, G.J. Kops, E.E. Voest, and R.H. Medema. 2014. Distinct phosphatases antagonize the p53 response in different phases of the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111:7313-7318.
- Sherr, C.J., and J.M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development*. 13:1501-1512.
- Shimada, M., and M. Nakanishi. 2013. Response to DNA damage: why do we need to focus on protein phosphatases? *Frontiers in oncology*. 3:8.
- Shrivastav, M., L.P. De Haro, and J.A. Nickoloff. 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell research*. 18:134-147.
- Simanis, V., and P. Nurse. 1986. The cell cycle control gene *cdc2+* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell*. 45:261-268.
- Sims, J.K., and J.C. Rice. 2008. PR-Set7 establishes a repressive trans-tail histone code that regulates differentiation. *Molecular and cellular biology*. 28:4459-4468.
- Skoufias, D.A., R.L. Indorato, F. Lacroix, A. Panopoulos, and R.L. Margolis. 2007. Mitosis persists in the absence of Cdk1 activity when proteolysis or protein phosphatase activity is suppressed. *The Journal of cell biology*. 179:671-685.
- Smith, J., L.M. Tho, N. Xu, and D.A. Gillespie. 2010. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in cancer research*. 108:73-112.

- Steen, R.L., M. Beullens, H.B. Landsverk, M. Bollen, and P. Collas. 2003. AKAP149 is a novel PP1 specifier required to maintain nuclear envelope integrity in G1 phase. *Journal of cell science*. 116:2237-2246.
- Stolz, A., N. Ertych, and H. Bastians. 2011. Tumor suppressor CHK2: regulator of DNA damage response and mediator of chromosomal stability. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 17:401-405.
- Su, K.C., T. Takaki, and M. Petronczki. 2011. Targeting of the RhoGEF Ect2 to the equatorial membrane controls cleavage furrow formation during cytokinesis. *Developmental cell*. 21:1104-1115.
- Sudakin, V., G.K. Chan, and T.J. Yen. 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *The Journal of cell biology*. 154:925-936.
- Suijkerbuijk, S.J., M. Vleugel, A. Teixeira, and G.J. Kops. 2012. Integration of kinase and phosphatase activities by BUBR1 ensures formation of stable kinetochore-microtubule attachments. *Developmental cell*. 23:745-755.
- Sullivan, M., and D.O. Morgan. 2007. Finishing mitosis, one step at a time. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 8:894-903.
- Sun, Y., Y. Xu, K. Roy, and B.D. Price. 2007. DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. *Molecular and cellular biology*. 27:8502-8509.
- Syljuasen, R.G. 2007. Checkpoint adaptation in human cells. *Oncogene*. 26:5833-5839.
- Syljuasen, R.G., S. Jensen, J. Bartek, and J. Lukas. 2006. Adaptation to the ionizing radiation-induced G2 checkpoint occurs in human cells and depends on checkpoint kinase 1 and Polo-like kinase 1 kinases. *Cancer research*. 66:10253-10257.
- Takai, H., K. Naka, Y. Okada, M. Watanabe, N. Harada, S. Saito, C.W. Anderson, E. Appella, M. Nakanishi, H. Suzuki, K. Nagashima, H. Sawa, K. Ikeda, and N. Motoyama. 2002. Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *The EMBO journal*. 21:5195-5205.
- Tang, Z., H. Shu, D. Oncel, S. Chen, and H. Yu. 2004. Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Molecular cell*. 16:387-397.
- Tanno, Y., T.S. Kitajima, T. Honda, Y. Ando, K. Ishiguro, and Y. Watanabe. 2010. Phosphorylation of mammalian Sgo2 by Aurora B recruits PP2A and MCAK to centromeres. *Genes & development*. 24:2169-2179.
- Tarapore, P., and K. Fukasawa. 2002. Loss of p53 and centrosome hyperamplification. *Oncogene*. 21:6234-6240.
- Tarapore, P., H.F. Horn, Y. Tokuyama, and K. Fukasawa. 2001. Direct regulation of the centrosome duplication cycle by the p53-p21Waf1/Cip1 pathway. *Oncogene*. 20:3173-3184.
- Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi, N. Shinya, A. Iwamatsu, and E. Nishida. 2001. Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature*. 410:215-220.
- Trautmann, S., S. Rajagopalan, and D. McCollum. 2004. The *S. pombe* Cdc14-like phosphatase Clp1p regulates chromosome biorientation and interacts with Aurora kinase. *Developmental cell*. 7:755-762.
- Trautmann, S., B.A. Wolfe, P. Jorgensen, M. Tyers, K.L. Gould, and D. McCollum. 2001. Fission yeast Clp1p phosphatase regulates G2/M transition and coordination of cytokinesis with cell cycle progression. *Current biology : CB*. 11:931-940.
- Trinkle-Mulcahy, L., J. Andersen, Y.W. Lam, G. Moorhead, M. Mann, and A.I. Lamond. 2006. Repo-Man recruits PP1 gamma to chromatin and is essential for cell viability. *The Journal of cell biology*. 172:679-692.
- Trinkle-Mulcahy, L., and A.I. Lamond. 2006. Mitotic phosphatases: no longer silent partners. *Current opinion in cell biology*. 18:623-631.

- Tumurbaatar, I., O. Cizmecioglu, I. Hoffmann, I. Grummt, and R. Voit. 2011. Human Cdc14B promotes progression through mitosis by dephosphorylating Cdc25 and regulating Cdk1/cyclin B activity. *PLoS one*. 6:e14711.
- Umar, A., C.R. Boland, J.P. Terdiman, S. Syngal, A. de la Chapelle, J. Ruschoff, R. Fishel, N.M. Lindor, L.J. Burgart, R. Hamelin, S.R. Hamilton, R.A. Hiatt, J. Jass, A. Lindblom, H.T. Lynch, P. Peltomaki, S.D. Ramsey, M.A. Rodriguez-Bigas, H.F. Vasen, E.T. Hawk, J.C. Barrett, A.N. Freedman, and S. Srivastava. 2004. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute*. 96:261-268.
- Uzunova, K., B.T. Dye, H. Schutz, R. Ladurner, G. Petzold, Y. Toyoda, M.A. Jarvis, N.G. Brown, I. Poser, M. Novatchkova, K. Mechtler, A.A. Hyman, H. Stark, B.A. Schulman, and J.M. Peters. 2012. APC15 mediates CDC20 autoubiquitylation by APC/C(MCC) and disassembly of the mitotic checkpoint complex. *Nature structural & molecular biology*. 19:1116-1123.
- Vader, G., R.H. Medema, and S.M. Lens. 2006. The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *The Journal of cell biology*. 173:833-837.
- Vagnarelli, P., D.F. Hudson, S.A. Ribeiro, L. Trinkle-Mulcahy, J.M. Spence, F. Lai, C.J. Farr, A.I. Lamond, and W.C. Earnshaw. 2006. Condensin and Repo-Man-PP1 co-operate in the regulation of chromosome architecture during mitosis. *Nature cell biology*. 8:1133-1142.
- Vagnarelli, P., S. Ribeiro, L. Sennels, L. Sanchez-Pulido, F. de Lima Alves, T. Verheyen, D.A. Kelly, C.P. Ponting, J. Rappsilber, and W.C. Earnshaw. 2011. Repo-Man coordinates chromosomal reorganization with nuclear envelope reassembly during mitotic exit. *Developmental cell*. 21:328-342.
- van Leuken, R., L. Clijsters, and R. Wolthuis. 2008. To cell cycle, swing the APC/C. *Biochimica et biophysica acta*. 1786:49-59.
- van Vugt, M.A., A.K. Gardino, R. Linding, G.J. Ostheimer, H.C. Reinhardt, S.E. Ong, C.S. Tan, H. Miao, S.M. Keezer, J. Li, T. Pawson, T.A. Lewis, S.A. Carr, S.J. Smerdon, T.R. Brummelkamp, and M.B. Yaffe. 2010. A mitotic phosphorylation feedback network connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to inactivate the G(2)/M DNA damage checkpoint. *PLoS biology*. 8:e1000287.
- van Vugt, M.A., and R.H. Medema. 2005. Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1. *Oncogene*. 24:2844-2859.
- Vanoosthuyse, V., and K.G. Hardwick. 2009. A novel protein phosphatase 1-dependent spindle checkpoint silencing mechanism. *Current biology : CB*. 19:1176-1181.
- Vazquez-Novelle, M.D., V. Esteban, A. Bueno, and M.P. Sacristan. 2005. Functional homology among human and fission yeast Cdc14 phosphatases. *The Journal of biological chemistry*. 280:29144-29150.
- Vazquez-Novelle, M.D., N. Mailand, S. Ovejero, A. Bueno, and M.P. Sacristan. 2010. Human Cdc14A phosphatase modulates the G2/M transition through Cdc25A and Cdc25B. *The Journal of biological chemistry*. 285:40544-40553.
- Vazquez-Novelle, M.D., and M. Petronczki. 2010. Relocation of the chromosomal passenger complex prevents mitotic checkpoint engagement at anaphase. *Current biology : CB*. 20:1402-1407.
- Vigneron, S., E. Brioudes, A. Burgess, J.C. Labbe, T. Lorca, and A. Castro. 2009. Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A. *The EMBO journal*. 28:2786-2793.
- Vilenchik, M.M., and A.G. Knudson. 2003. Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:12871-12876.
- Virshup, D.M., and S. Shenolikar. 2009. From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Molecular cell*. 33:537-545.

- Visconti, R., L. Palazzo, R. Della Monica, and D. Grieco. 2012. Fcp1-dependent dephosphorylation is required for M-phase-promoting factor inactivation at mitosis exit. *Nature communications*. 3:894.
- Voets, E., and R.M. Wolthuis. 2010. MASTL is the human orthologue of Greatwall kinase that facilitates mitotic entry, anaphase and cytokinesis. *Cell cycle*. 9:3591-3601.
- Watanabe, N., H. Arai, J. Iwasaki, M. Shiina, K. Ogata, T. Hunter, and H. Osada. 2005. Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:11663-11668.
- Watanabe, N., H. Arai, Y. Nishihara, M. Taniguchi, N. Watanabe, T. Hunter, and H. Osada. 2004. M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:4419-4424.
- Wei, R., B. Ngo, G. Wu, and W.H. Lee. 2011a. Phosphorylation of the Ndc80 complex protein, HEC1, by Nek2 kinase modulates chromosome alignment and signaling of the spindle assembly checkpoint. *Molecular biology of the cell*. 22:3584-3594.
- Wei, R.R., J. Al-Bassam, and S.C. Harrison. 2007. The Ndc80/HEC1 complex is a contact point for kinetochore-microtubule attachment. *Nature structural & molecular biology*. 14:54-59.
- Wei, Z., S. Peddibhotla, H. Lin, X. Fang, M. Li, J.M. Rosen, and P. Zhang. 2011b. Early-onset aging and defective DNA damage response in Cdc14b-deficient mice. *Molecular and cellular biology*. 31:1470-1477.
- Welburn, J.P., M. Vleugel, D. Liu, J.R. Yates, 3rd, M.A. Lampson, T. Fukagawa, and I.M. Cheeseman. 2010. Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Molecular cell*. 38:383-392.
- Willems, P., K. Claes, A. Baeyens, V. Vandersickel, J. Werbrouck, K. De Ruyck, B. Poppe, R. Van den Broecke, A. Makar, E. Marras, G. Perletti, H. Thierens, and A. Vral. 2008. Polymorphisms in nonhomologous end-joining genes associated with breast cancer risk and chromosomal radiosensitivity. *Genes, chromosomes & cancer*. 47:137-148.
- Wolfe, B.A., W.H. McDonald, J.R. Yates, 3rd, and K.L. Gould. 2006. Phospho-regulation of the Cdc14/Clp1 phosphatase delays late mitotic events in *S. pombe*. *Developmental cell*. 11:423-430.
- Wu, J., H.P. Cho, D.B. Rhee, D.K. Johnson, J. Dunlap, Y. Liu, and Y. Wang. 2008. Cdc14B depletion leads to centriole amplification, and its overexpression prevents unscheduled centriole duplication. *The Journal of cell biology*. 181:475-483.
- Wu, J.Q., J.Y. Guo, W. Tang, C.S. Yang, C.D. Freel, C. Chen, A.C. Nairn, and S. Kornbluth. 2009. PP1-mediated dephosphorylation of phosphoproteins at mitotic exit is controlled by inhibitor-1 and PP1 phosphorylation. *Nature cell biology*. 11:644-651.
- Wu, S., W. Wang, X. Kong, L.M. Congdon, K. Yokomori, M.W. Kirschner, and J.C. Rice. 2010. Dynamic regulation of the PR-Set7 histone methyltransferase is required for normal cell cycle progression. *Genes & development*. 24:2531-2542.
- Wurzenberger, C., M. Held, M.A. Lampson, I. Poser, A.A. Hyman, and D.W. Gerlich. 2012. Sds22 and Repo-Man stabilize chromosome segregation by counteracting Aurora B on anaphase kinetochores. *The Journal of cell biology*. 198:173-183.
- Yamagishi, Y., C.H. Yang, Y. Tanno, and Y. Watanabe. 2012. MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components. *Nature cell biology*. 14:746-752.
- Yan, X., Y. Wu, Q. Li, L. Cao, X. Liu, H. Saiyin, and L. Yu. 2005. Cloning and characterization of a novel human Aurora C splicing variant. *Biochemical and biophysical research communications*. 328:353-361.
- Yata, K., and F. Esashi. 2009. Dual role of CDKs in DNA repair: to be, or not to be. *DNA repair*. 8:6-18.

- Yoo, H.Y., A. Kumagai, A. Shevchenko, A. Shevchenko, and W.G. Dunphy. 2004. Adaptation of a DNA replication checkpoint response depends upon inactivation of Claspin by the Polo-like kinase. *Cell*. 117:575-588.
- Yu, J., S.L. Fleming, B. Williams, E.V. Williams, Z. Li, P. Somma, C.L. Rieder, and M.L. Goldberg. 2004. Greatwall kinase: a nuclear protein required for proper chromosome condensation and mitotic progression in *Drosophila*. *The Journal of cell biology*. 164:487-492.
- Yuan, K., H. Hu, Z. Guo, G. Fu, A.P. Shaw, R. Hu, and X. Yao. 2007. Phospho-regulation of HsCdc14A By Polo-like kinase 1 is essential for mitotic progression. *The Journal of biological chemistry*. 282:27414-27423.
- Zhao, Y., and R.H. Chen. 2006. Mps1 phosphorylation by MAP kinase is required for kinetochore localization of spindle-checkpoint proteins. *Current biology : CB*. 16:1764-1769.
- Zou, L., and S.J. Elledge. 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*. 300:1542-1548.

AGRADECIMIENTOS

Una tesis doctoral no solo refleja el trabajo de Investigación desarrollado por una persona durante un período de tiempo sino que también implica el trabajo de muchas otras que prestan su apoyo y ayuda durante este período de formación. Por todo ello, me gustaría terminar este trabajo de tesis doctoral agradeciendo a todas aquellas personas que me han ayudado a llegar hasta aquí, tanto colaborando directamente en la realización de este trabajo como aconsejándome, apoyándome y guiándome durante este tiempo.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi directora de tesis María que me diera la oportunidad de unirme a la familia de “humanas”. Gracias María por dirigirme, enseñarme y guiarme durante estos años, y sobre todo por saber aconsejarme tanto a nivel de laboratorio como a nivel personal. También me gustaría agradecer a Avelino que me acogiese en mis inicios en este mundo de la Ciencia en la familia de levaduras y por el apoyo recibido durante estos años.

Gracias a todos los compis de laboratorio porque al cabo de estos cinco años de convivir diariamente pasan a formar parte de una mini-familia. A ti Sara, porque tu inmensa ayuda tanto técnica como personal ha sido de suma importancia para la realización de este trabajo doctoral. A ti Vanesa, por estar siempre pendiente de los demás intentando ayudar en todo lo posible tanto a nivel de laboratorio como personal porque es una suerte haberte conocido. A ti Sonia, por tu ayuda y apoyo tanto a mí como a toda la gente del laboratorio durante estos años. A ti Alfonso, por explicarme siempre cualquier duda con una sonrisa en la cara y aconsejarme en todas mis dudas. A Laura, espero que todo te vaya muy bien en esta nueva etapa.

Gracias también a todas aquellas personas que ya no están en el laboratorio pero que de una forma u otra me han ayudado con sus conocimientos, sugerencias y ánimos. Entre ellos, gracias a Laura, Pilar, Arturo, Sandra y a las “topillo becarias” Cris, Bea, Janine y Amalia.

Me gustaría también agradecer a otras personas del CIC de las cuales he recibido también muchos consejos, sugerencias y apoyo. Gracias al vecino de laboratorio David, a los chicuelos Carlos y Dani y al siempre alegre Paco.

Además de las personas que te ayudan de forma directa en la realización de la tesis doctoral hay muchas otras que te ayudan a nivel personal alegrándote el día a día y permitiéndote desconectar. Por todo ello, muchas gracias a mis “petardillas” pucelanas Ana, Virginia, María, Miriam, Oilda y Jimena por todos nuestros buenos momentos y también a mis Supernenas salmantinas Mari, Rosa, Alicia, Sheila, Cristina y Aroa por todas nuestras anécdotas y risas durante todos estos años.

Para el inicio de cualquier nuevo proyecto siempre resulta de suma importancia la confianza y el apoyo de las personas que te quieren y te apoyan de forma incondicional. Por ello, me gustaría agradecer especialmente a mis padres por aconsejarme para que me iniciase en este mundo de la Ciencia y por apoyarme durante estos años buscando siempre lo mejor para mí.

Por último, me gustaría agradecer a los miembros del tribunal y a todas aquellas personas que me han permitido exponer ante ellos mi trabajo de Investigación desarrollado durante estos años.

A todos vosotros, muchas gracias.