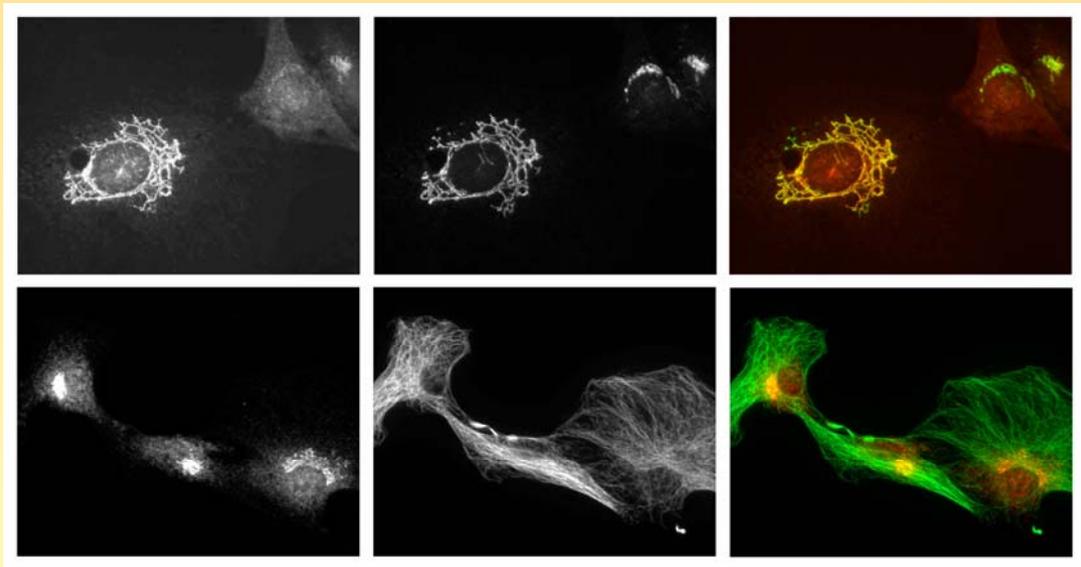




FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA PTTG1 EN LA
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN
dlk1 EN PROCESOS DE PROLIFERACIÓN Y
DIFERENCIACIÓN. ANÁLISIS FUNCIONAL
DE LAS ISOFORMAS PTTG1, PTTG2 Y PTTG3



Águeda Gema Espina Zambrano

Sevilla, 2010

Tesis Doctoral presentada por la licenciada Águeda Gema
Espina Zambrano para optar al grado de Doctora en
Biología

Sevilla, septiembre de 2010

Director del trabajo

Tutor de la Tesis

Dr. José Antonio Pintor-Toro

Dr. Francisco Ramos Morales

Prof. de Investigación del CSIC

Profesor Titular de Genética

Dpto. de Señalización Celular

Facultad de Biología

CABIMER-Sevilla

Universidad de Sevilla

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| I. ABREVIATURAS..... | 3 |
| II. INTRODUCCIÓN..... | 7 |
| 1. ESTRUCTURA GÉNICA DE PTTG..... | 8 |
| 2. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE PTTG..... | 10 |
| 3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PTTG..... | 11 |
| 4. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA PTTG..... | 13 |
| 5. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE hPTTG..... | 16 |
| 5.1. Fosforilación de hPTTG..... | 16 |
| 5.2. Ubiquitinación de hPTTG..... | 18 |
| 6. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE hPTTG..... | 20 |
| 7. FAMILIA GÉNICA DE hPTTG..... | 23 |
| 7.1. Clonación y caracterización de <i>pttg2</i> y <i>pttg3</i> | 23 |
| 7.2. Patrón de expresión de los miembros de la familia de <i>pttg1</i> | 24 |
| 8. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE PTTG1..... | 25 |
| 8.1. Función de securina..... | 25 |
| 8.2. Reparación del daño al DNA..... | 31 |
| 8.3. Actividad transactivadora..... | 35 |
| 8.4. Control de la transición G1/ S..... | 37 |
| 9. MECANISMOS TUMORIGÉNICOS DE PTTG1..... | 38 |
| 9.1. Inestabilidad cromosómica y aneuploidías..... | 38 |
| 9.2. Inducción o inhibición de apoptosis..... | 40 |
| 9.3. Angiogénesis y microambiente tumorigénico..... | 42 |
| 9.4. Capacidad metastásica y peor pronóstico de los tumores..... | 44 |
| 10. MODELOS DE RATONES KNOCK-OUT PARA PTTG1..... | 44 |
| 11. MODELOS DE RATONES QUE SOBREEXPRESAN PTTG1..... | 46 |

| | |
|---|-----------|
| III. OBJETIVOS..... | 51 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 55 |
| 1. MATERIALES..... | 55 |
| 1.1. Líneas celulares..... | 55 |
| 1.2. Drogas..... | 56 |
| 1.3. Anticuerpos primarios..... | 56 |
| 1.4. Anticuerpos secundarios..... | 58 |
| 1.5. Plásmidos..... | 59 |
| 1.6. Oligonucleótidos de iRNA..... | 59 |
| 2. MÉTODOS..... | 60 |
| 2.1. Manipulación del DNA..... | 60 |
| 2.1.1. Purificación de plásmidos de bacterias..... | 60 |
| 2.1.2. Cuantificación del DNA..... | 60 |
| 2.1.3. Digestión de DNA con enzimas de restricción..... | 61 |
| 2.1.4. Electroforesis de DNA..... | 61 |
| 2.1.5. Purificación de fragmentos de DNA de geles..... | 61 |
| 2.1.6. Ligación de moléculas de DNA..... | 61 |
| 2.2. Transformación de bacterias..... | 62 |
| 2.2.1. Transformación química..... | 62 |
| 2.2.2. Electroporación..... | 62 |
| 2.3. Mutagénesis dirigida..... | 62 |
| 2.4. Cultivos celulares..... | 63 |
| 2.4.1. Descongelación, subcultivo y congelación de células... | 63 |
| 2.4.2. Sincronización de cultivos..... | 64 |
| 2.5. Transfección transitoria de células de mamífero..... | 65 |
| 2.5.1. Electroporación..... | 65 |

| | |
|---|----|
| 2.5.2. FuGENE 6..... | 66 |
| 2.5.3. Lipofectamina 2000..... | 67 |
| 2.6. Obtención de células estables NIH3T3-pttg1..... | 67 |
| 2.7. Inhibición de la expresión de <i>pttg1</i> , <i>pttg2</i> , <i>pttg3</i> y <i>dlk1</i> mediante RNA de interferencia..... | 68 |
| 2.8. Análisis del RNA..... | 69 |
| 2.8.1. Aislamiento de RNA total..... | 69 |
| 2.8.2. Cuantificación de RNA..... | 69 |
| 2.8.3. Electroforesis de RNA y transferencia a membrana de nailon (<i>northern blot</i>)..... | 69 |
| 2.8.4. Marcaje radiactivo de la sonda de DNA..... | 70 |
| 2.8.5. Hibridación radiactiva..... | 70 |
| 2.9. <i>Differential display</i> | 71 |
| 2.10. <i>Array</i> de cDNA..... | 72 |
| 2.11. Análisis de proteínas..... | 72 |
| 2.11.1. Extracción de proteínas de cultivos celulares..... | 72 |
| a. Extractos totales NP40..... | 72 |
| b. Extractos totales RIPA..... | 73 |
| 2.11.2. Producción y purificación de proteínas de fusión en bacterias..... | 73 |
| a. PTTG1-GST Y PTTG2-GST..... | 73 |
| b. PTTG1-His, PTTG2-His y PTTG3-His..... | 74 |
| 2.11.3. Cuantificación de proteínas por el método Bradford | 75 |
| 2.11.4. Electroforesis de proteínas en gel de | |

| | |
|---|-----------|
| poliacrilamida-SDS..... | 75 |
| 2.11.5. Detección de proteínas con azul de Comassie..... | 76 |
| 2.11.6. Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa..... | 76 |
| 2.11.7. Inmunodetección..... | 76 |
| 2.12. Purificación de anticuerpos anti-PTTG1..... | 77 |
| 2.12.1. Por cromatografía de afinidad en columna..... | 77 |
| 2.12.2. Por cromatografía de afinidad en membrana de nitrocelulosa..... | 79 |
| 2.13. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo..... | 79 |
| 2.14. Subfraccionamiento celular..... | 80 |
| 2.15. Inmunofluorescencia indirecta..... | 81 |
| 2.16. Obtención de lentivirus..... | 82 |
| 2.17. Inmunohistoquímica..... | 83 |
| 2.18. Ensayos de diferenciación..... | 84 |
| 2.19. Coimmunoprecipitación..... | 84 |
| 2.20. Obtención de nuevos anticuerpos frente a PTTG1 por la técnica del <i>Phage display</i> | 85 |
| V. RESULTADOS..... | 89 |
| CAPÍTULO 1º..... | 89 |
| 1. DETERMINACIÓN, A NIVEL TRANSCRIPCIONAL Y TRADUCCIO- NAL, DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>dlk1</i> EN LÍNEAS CELULARES QUE SOBREEXPRESAN PTTG1..... | 89 |

| | |
|--|-----|
| 2. EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE <i>pttg1</i> SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE PREADIPOCITOS..... | 96 |
| 3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE <i>Dlk1</i> EN TEJIDOS NORMALES. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA EXPRESIÓN DE PTTG1 Y <i>DLK1</i> EN TEJIDOS NORMALES..... | 99 |
| 4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE <i>Pttg1</i> Y <i>Dlk1</i> EN ADENOMAS DE PITUITARIA, ADENOCARCINOMAS DE MAMA Y NEUROBLASTOMAS..... | 101 |
| | |
| CAPÍTULO 2°..... | 105 |
| | |
| 1. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PTTG1. | 105 |
| 2. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA PTTG1 POR INMUNOFLUORESCENCIA EN CULTIVO ASINCRÓNICO..... | 106 |
| 3. SINCRONIZACIÓN DE LOS CULTIVOS EN FASE G1..... | 109 |
| 4. LOCALIZACIÓN DE PTTG1 EN CÉLULAS HUMANAS NO TUMORALES..... | 110 |
| 5. SUBFRACCIONAMIENTO CELULAR EN CÉLULAS HL60..... | 111 |
| 6. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA PTTG DE RATÓN. SOBREENPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HUMANA EN UN SISTEMA HETERÓLOGO..... | 112 |
| 7. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA ECTÓPICA PTTG1 FUSIONADA A DIFERENTES EPITOPOS..... | 115 |
| 8. DESESTRUCTURACIÓN DEL COMPLEJO DE GOLGI Y EFECTOS SOBRE LA LOCALIZACIÓN DE PTTG1..... | 116 |

| | |
|---|---------|
| 9. <i>TIME-LAPSE</i> DE CÉLULAS QUE EXPRESAN DE FORMA TRANSITORIA PTTG1-GFP..... | 118 |
| 10. INMUNOCITOQUÍMICA DE CÉLULAS RPE-1 EMPLEANDO UN ANTICUERPO MONOCATENARIO FRENTE A PTTG1 OBTENIDO POR LA TÉCNICA DE <i>PHAGE DISPLAY</i> | 119 |
| 11. SILENCIAMIENTO DE PTTG1 MEDIANTE OLIGOS DE <i>i</i> RNA ESPECÍFICOS..... | 119 |
| 12. SILENCIAMIENTO DE PTTG1 MEDIANTE <i>i</i> RNAS ESPECÍFICOS EXPRESADOS ESTABLEMENTE POR LENTIVIRUS..... | 121 |
| CAPÍTULO 3º..... | 125 |
| 1. INTERFERENCIA CONJUNTA DE LOS GENES <i>pttg1</i> , <i>pttg2</i> Y <i>pttg3</i> . ESTUDIO DEL MARCAJE DE GOLGI Y EFECTOS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR..... | 125 |
| 2. SILENCIAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS PTTG2 Y PTTG3 VERSUS PTTG1. EFECTOS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR E IMPLICACIÓN DE p53..... | 127 |
| 3. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS PTTG2 Y PTTG3 EN BACTERIAS Y OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS..... | 133 |
| 3.1. Caracterización y localización subcelular de PTTG2..... | 133 |
| 3.2. Efectos de la supresión de PTTG2 en las células..... | 138 |
| 3.3. Localización subcelular de PTTG3..... | 141 |
| VI. DISCUSIÓN..... | 153 |

| | |
|--|------------|
| 1. IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA PTTG1 EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>dtk1</i> EN PROCESOS DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN..... | 153 |
| 2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PTTG1..... | 157 |
| 3. CARACTERIZACIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS ISOFORMAS PTTG2 Y PTTG3. EFECTOS DE SU SILENCIAMIENTO EN LA CÉLULA..... | 165 |
| VII. CONCLUSIONES..... | 171 |
| VIII. BIBLIOGRAFÍA..... | 175 |

I. ABREVIATURAS

| | |
|------------------------------|---|
| aa | Aminoácido |
| Arf1 | <i>ADP-ribosylation factor-1</i> |
| AT | Adenina-Timina |
| ATP | Adenosín 5'-trifosfato |
| BRCA1 | <i>Breast Cancer 1</i> |
| BrdU | Bromodesoxiuridina |
| CHX | Cicloheximida |
| CLSM | <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> |
| COP | <i>Coat Protein</i> |
| CRS | <i>Cytoplasmic Retention Signal</i> |
| DAPI | <i>4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride</i> |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNA-PK | Proteína quinasa dependiente de DNA |
| E2F | <i>Elongation Factor 2</i> |
| Esp1 | <i>Extra spindle poles 1</i> |
| EtBr | Bromuro de etidio |
| FBS | Suero fetal bovino |
| FGF | Factor de crecimiento de fibroblastos |
| GFP | Proteína fluorescente verde |
| GH | Hormona de crecimiento |
| GM130 | <i>Golgi Membrane Protein of 130 KDa</i> |
| GST | Glutation-S-Transferasa |
| HEK | <i>Human Embryonic Kidney</i> |
| HGF | Factor de crecimiento de hepatocitos |
| IPTG | Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido |
| iRNA | ARN de interferencia |
| MAP7 | <i>Microtubule-associated protein 7</i> |
| MOI | Multiplicidad de infección |
| mRNA | ARN mensajero |
| NCS | Suero de ternera recién nacida |
| NLS | Señal de localización nuclear |
| NP40 | <i>Nonidet P-40</i> |
| OD | Densidad óptica |
| PCNA | Antígeno nuclear de proliferación celular |
| PLK1 | <i>Polo-like kinase 1</i> |
| PMSF | <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> |
| PRL | Prolactina |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| TGFβ | Factor de crecimiento transformante- β |
| TSP-1 | Trombospondina-1 |
| TSS | Sitio de inicio de la transcripción |
| TUTR1 | <i>Human Tumor-Transforming Gene 1</i> |
| USF1 | <i>Upstream Stimulatory Factor 1</i> |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial vascular |

| | |
|------------|--|
| WB | <i>Western Blot</i> |
| g | Gramo o Fuerza de gravedad, según contexto |
| h | Hora |
| kb | Kilobase |
| kDa | Kilodalton |
| l | Litro |
| M | Molar |
| mg | Miligramo |
| min | Minuto |
| ml | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| Nm | Nanómetro |
| PM | Peso Molecular |
| p/v | Peso/Volumen |
| v/v | Volumen/Volumen |
| µg | Microgramo |
| µl | Microlitro |
| µM | Micromolar |
| °C | Grado Celsius |

II. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de un tumor maligno es un proceso que requiere mutaciones en varios genes, el conjunto de las cuales confiere ventajas en el crecimiento celular. Un hecho habitual en la conversión de una célula normal en tumoral es la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores tumorales. Hay además genes que contribuyen a la formación o al progreso de los tumores como son los genes implicados en la reparación del DNA. La acumulación de mutaciones en estos genes genera células con nuevas características o capacidades como la resistencia a apoptosis o la proliferación independiente de la presencia de factores de crecimiento. La célula normal mantiene una exquisita regulación entre las señales que promueven y las que restringen el crecimiento. De ahí que en células tumorales se encuentren genes desregulados que participan en procesos de gran importancia como la división y muerte celular y la reparación del daño en el DNA.

PTTG

El gen *pttg* (*pituitary tumor-transforming gene*) fue aislado por primera vez en 1997 a partir de células tumorales de hipófisis de rata y fue caracterizado e identificado como un nuevo oncogén (*Pei et al., 1997*). La analogía bioquímica y el análisis funcional condujeron a la identificación de PTTG como una securina de vertebrados, que regula la separación de las cromátidas hermanas durante la mitosis (*Zou et al., 1999*).

Tanto el mRNA como la proteína PTTG están sobreexpresados en una gran variedad de tumores endocrinos, especialmente en hipófisis, tiroides, mama, ovario y tumores uterinos, así como en otros no endocrinos asociados al sistema nervioso central, pulmonar o gastrointestinal (*Domínguez et al., 1998; Sáez et al., 1999; Zhang et al., 1999; Heaney et al., 2000; Heaney et al., 2001; Puri et al., 2001; Tsai et al., 2001; Sáez et al., 2002; Solbach et al., 2004; Chamaon et al., 2005; Kakar et al., 2006; Sáez et al., 2006*). Los niveles de PTTG están correlacionados directamente con la invasividad del tumor (*Heaney et al., 2000; Boelaert et al., 2003*), habiéndose asociado el gen *pttg* con el proceso metastásico (*Ramaswamy et al., 2003*).

PTTG participa en importantes procesos celulares básicos como la división y diferenciación celular (*Zou et al., 1999; Ramos-Morales et al., 2000; Espina et al., 2009*), y la reparación del daño al DNA (*Romero et al., 2001; Bernal et al., 2002; Bernal et al., 2008*), así como en diferentes procesos fisiológicos como el desarrollo de órganos y el metabolismo (*Wang et al., 2001; Wang et al., 2003*).

1. ESTRUCTURA GÉNICA DE PTTG

pttg fue aislado de una línea celular de hipófisis de rata secretora de GH (*Grow Hormone*) por el método de *differential display*, analizando los mRNA que se expresaban más en hipófisis tumorales que en hipófisis sanas (*Pei et al., 1997*). El fragmento aislado de 396 pb correspondía a un mRNA de 1,3 kb y se utilizó como sonda para rastrear una genoteca de cDNA generada a partir de la línea celular GH4 de hipófisis de rata. Uno de los clones aislados contenía un fragmento de 974 pb, que daba lugar a una ORF (*Open Reading Frame*) de 199 aminoácidos. La traducción *in vitro* de esta secuencia generaba una proteína de peso aparente de 25 kDa, que no mostraba homología con ninguna proteína conocida, ni contenía dominios funcionales conocidos (*Pei y Melmed, 1997*).

El análisis por *northern* reveló la existencia de dos formas de RNA mensajero; una de 1.3 kb que se expresaba abundantemente en células de tumor de hipófisis, y otra de aproximadamente 1.0 kb que se expresaba preferentemente en testículo y en hígado embrionario (*Pei et al., 1997*). En ambos transcritos, el inicio de la transcripción se localizaba en el residuo de timidina 44 pb aguas arriba del codón ATG de inicio de traducción (*Pei, 1998*), indicando la existencia de un *splicing* alternativo.

Simultáneamente, nuestro laboratorio aisló el gen humano homólogo al gen *pttg* de rata, a partir de una genoteca de cDNA de células Jurkat y de timo (*Domínguez et al., 1998*) y al que se denominó *hpttg*. El clon *hpttg* aislado de

mayor tamaño contenía un fragmento de 787 pb, con una ORF de 609 pb, que codificaba una proteína de 202 aminoácidos, con un peso molecular calculado de 22,024 kDa (aunque su peso molecular aparente en gel de poliacrilamida era de 29 kDa aproximadamente) y un *pI* (punto isoeléctrico) de 6,55 (Domínguez *et al.*, 1998).

El gen *hpttg* se localiza en el cromosoma 5 [5q35.1 (Kakar, 1999)] y tiene un tamaño aproximado de 10 kb. En un principio se pensó que estaba organizado en 5 exones de 130, 185, 94, 160 y 140 pb, y 4 intrones de 0.3, 1.2, 2.4 y 0.69 kb, respectivamente (Zhang *et al.*, 1999; Kakar, 1999); sin embargo, posteriormente se publicó la existencia de un exón adicional de 159 pb dentro de la región 5' no codificante, seguido de un intrón de 147 pb (Clem *et al.*, 2003), por lo que el gen se estructura en 6 exones y 5 intrones. En la Figura I se muestra un esquema de la estructura del gen *pttg* humano, de rata y ratón.

El análisis por *northern* de la expresión de *hpttg* reveló la existencia de un único transcrito de aproximadamente 1.3 kb (Domínguez *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Kakar, 1999); sin embargo, en hígado fetal el tamaño detectado era de aproximadamente 0.8 kb (Zhang *et al.*, 1999). El sitio de inicio de la transcripción se localiza en un residuo de adenina distante 37 pb del ATG donde comienza la traducción, y existe un segundo sitio de inicio de la transcripción 317 pb aguas arriba del ATG (Kakar, 1999; Clem, 2003). Deleciones seriadas del promotor indican que la secuencia desde -126 hasta +34 pb es suficiente para promover la actividad del promotor de *hpttg* y que la secuencia comprendida entre los nucleótidos -706 y -407 contiene un elemento potenciador (Kakar, 1999).

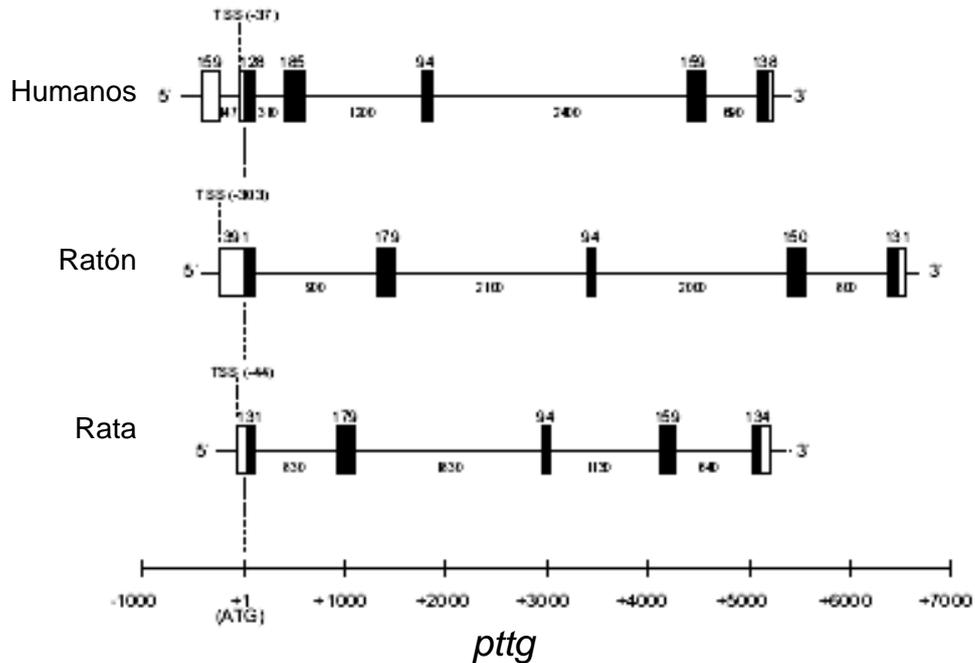


Figura I: Esquema de la estructura del gen *pttg* de mamíferos. Los exones se indican como cajas (secuencias traducidas en negro y no traducidas en blanco) mientras que las líneas entre cajas representan los intrones. Se indican los tamaños en pb y el sitio de inicio de la traducción +1 (ATG). Los TSS (*T*ranscription *S*tart *S*ites) se indican relativos al ATG (*Vlotides, et al., 2007*).

2. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE PTTG

Estudios de expresión del mRNA de *pttg* de rata revelaron niveles detectables exclusivamente en testículo e hígado embrionario, siendo éstos menores que los niveles detectados en adenomas de hipófisis (*Pei et al., 1997*). En tejidos de ratón, sin embargo, se detectan niveles de expresión de mRNA Pttg en timo, bazo, testículo, ovario, así como en embriones intactos, pero no se detectan en hígado adulto, corazón, pulmón, cerebro y riñón (*Wang et al., 2000*).

En tejidos humanos adultos normales, la expresión de *pttg* es muy abundante en testículo y en timo y algo menor en placenta (*Zhang et al., 1999; Domínguez et al., 1998; Kakar et al., 1999*). Niveles de expresión más bajos también se han detectado en colon, intestino delgado y bazo (*Zhang et al.,*

1999; Domínguez *et al.*, 1998). En algunos casos, también se ha observado una señal débil en cerebro, páncreas (Zhang *et al.*, 1999) y pulmón (Domínguez *et al.*, 1998), mientras que no se ha detectado expresión alguna en leucocitos, corazón, hígado, músculo esquelético, riñón u ovario (Zhang *et al.*, 1999; Domínguez *et al.*, 1998). En tejido fetal humano, la expresión de *pttg* se detecta únicamente en hígado (Zhang *et al.*, 1999; Kakar *et al.*, 1999).

Pttg se sobreexpresa en la mayoría de las líneas celulares tumorales humanas, incluyendo líneas hematopoyéticas (línea promielocítica HL-60, células HeLa S3, línea de leucemia mielógena crónica K-562, leucemia linfoblástica MOLT-4 ó linfoma de Burkitt Raji), de carcinoma colorrectal SW480, carcinoma de pulmón A549, melanoma G361, hepatoma HepG2, carcinoma de mama MCF-7, endometrio HEC-101, y líneas celulares de tumor de ovario CaO4, PA1, SKOV3 y VOI101 (Zhang *et al.*, 1999; Kakar *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999).

En tumores, además de los niveles tan elevados de mRNA encontrados en los adenomas de hipófisis (Zhang *et al.*, 1999; Sáez *et al.*, 1999; Hunter *et al.*, 2003; McCabe *et al.*, 2003), la sobreexpresión de *pttg* se ha confirmado en carcinoma colorrectal (Heaney, 2000), de esófago (Shibata *et al.*, 2002), hígado (Cho-Rock *et al.*, 2006), mama (Sáez *et al.*, 1999; Solbach *et al.*, 2004), pulmón (Sáez *et al.*, 1999; Refeld *et al.*, 2006), tiroides (Boelaert *et al.*, 2003, Sáez *et al.*, 2006), ovario (Puri *et al.*, 2001), en miomas uterinos (Tsai *et al.*, 2005) y en neoplasias linfoides (Sáez *et al.*, 2002).

3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PTTG

El hecho de que *pttg* se exprese fundamentalmente en tejidos que proliferan activamente, como timo y testículo, así como en células tumorales, llevó a analizar la posible correlación entre la expresión de *pttg* y la proliferación celular. Así, se ha demostrado que el gen *hpttg* se expresa principalmente en células que proliferan, disminuyendo su expresión en células

privadas de suero (condición que provoca una parada del crecimiento), aumentando de nuevo al añadir el suero a las células y disminuyendo una vez más cuando las células llegan a confluencia (*Ramos-Morales et al., 2000*).

La expresión de *hpttg* en las diferentes fases del ciclo celular sigue pautas similares a las de una ciclina mitótica, ya que sus niveles son bajos en fase G1, aumentan en fase S, son máximos en G2/M y disminuyen bruscamente al final de mitosis. Este patrón de expresión durante el ciclo sugiere que *hpttg* está implicada en la progresión del ciclo celular. Hay que subrayar que en la fase G2/M *hpttg* es fosforilada por la quinasa mitótica cdc2/CDK1 en el residuo Serina 165, que se encuentra conservado en las proteínas PTTG humana, de rata y ratón (*Ramos-Morales et al., 2000*).

Se han descrito moléculas que afectan la expresión de *pttg*. Los estrógenos son importantes reguladores de la expresión génica de *pttg* en hipófisis (*Heaney et al., 1999; Yin et al., 2001; Heaney et al., 2002*). La adición de calcio en células tumorales de testículo de rata (H-500) desencadena una rápida y sostenida inducción de *pttg* (*Tfelt-Hansen et al., 2003*). La insulina y el factor de crecimiento IGF-I activan la transcripción de *hpttg* en células de tumor de mama (MCF-7) y en astrocitos malignos (*Chamaon et al., 2005; Thompson 3rd et al., 2005*). En células de astrocitoma (U87), la expresión de *hpttg* es también inducida por los ligandos EGF y TGF α , y por el factor de crecimiento de hepatocitos HGF (*Tfelt-Hansen et al., 2004*). Sin embargo, en la mayoría de estos casos se desconoce si la inducción de *hpttg* es un efecto directo del agente de tratamiento o es consecuencia de la probable proliferación inducida en las células por dichos agentes.

El factor de transcripción Sp1 y, a un menor nivel, el factor nuclear NF-Y, son importantes para la transcripción basal de *hpttg* (*Clem et al., 2003; Zhou et al., 2003*), particularmente en células tumorales. La delección del sitio de unión de Sp1 provoca un descenso de la transcripción del 70%, la del sitio de unión de NF-Y del 25%, y la de ambos disminuye la transcripción de *hpttg* en un 90%.

Las rutas de señalización de la β -catenina y del factor de células T (TCF) han sido implicadas en la regulación de *hpttg* en el cáncer de esófago y colorrectal (*Zhou et al., 2005; Hlubek et al., 2006*); sin embargo, se desconocen los mecanismos implicados en controlar la transcripción dependiente de ciclo celular de *hpttg* y los que conducen a su desregulación en las células transformadas.

4. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA PTTG

PTTG no muestra similitud estructural con ninguna otra proteína de la base de datos *GenBank* (*Pei et al., 1997; Zhang et al., 1999*). Atendiendo a la secuencia de ácidos nucleicos, la proteína PTTG de ratón, de rata y humana comprenden 196 (*Wang et al., 2000*), 199 (*Pei et al., 1997*) y 202 (*Zhang et al., 1999*) aminoácidos respectivamente. Así, en comparación con la proteína PTTG de ratón, la de rata y humana poseen 3 y 6 inserciones de aminoácidos respectivamente (*Wang et al., 2000*). La comparación de la secuencia de aminoácidos entre la proteína humana y la de rata reveló un 89% de identidad entre ellas (*Zhang et al., 1999*), mientras que la identidad con la secuencia de ratón era del 66 y 88 %, respectivamente (*Wang et al., 2000*). Aunque los tamaños esperados de PTTG de rata, ratón y humana son aproximadamente 21-22 kDa, la proteína PTTG de los primeros migra con un peso molecular aparente de 25 kDa (*Pei et al., 1997*) y la humana en torno a 28-30 kDa (*Domínguez et al., 1998; Yu et al., 2001*) en SDS-PAGE, sugiriendo modificaciones post-traduccionales.

La proteína PTTG de mamíferos comprende un dominio regulador N-terminal y un dominio funcional C-terminal (*Domínguez et al., 1998; Yu et al., 2001*). Como todas las securinas de vertebrados, no muestra similitud de secuencia con sus análogas en levaduras, pero existen patrones de secuencia conservados que son comunes a todas las securinas, como agrupaciones de dominios ácidos y básicos (*Sou et al., 1999*).

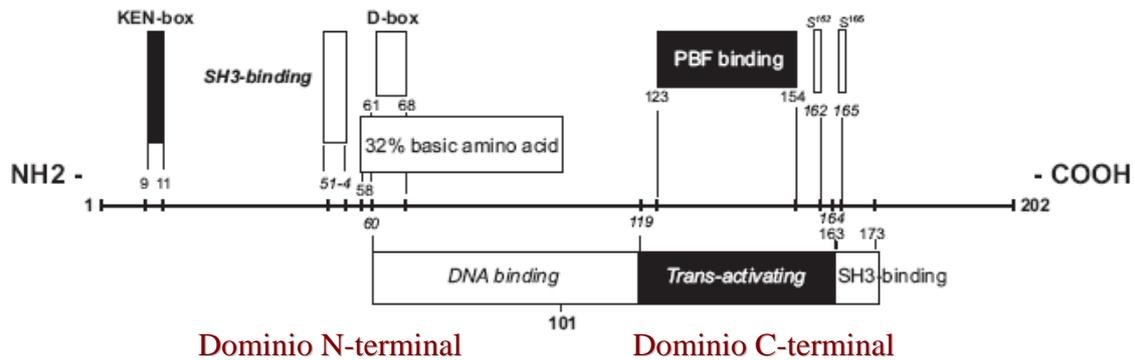


Figura II. Esquema de la proteína PTTG de mamíferos. La proteína comprende principalmente un dominio regulador N-terminal (izquierda) y un dominio funcional C-terminal (derecha). Se indican los dominios reguladores y funcionales, así como el sitio de unión a SH3 y residuos de Serina (Ser) relevantes. La posición de los elementos se indican con el número del residuo correspondiente (Vlotides *et al.*, 2007).

Experimentos realizados con extractos de oocitos de *Xenopus* indicaron que debía existir algún factor proteico cuya degradación (dependiente de APC) fuese requisito previo para la separación de las cromátidas hermanas (Holloway *et al.*, 1993). Proteínas con dicha actividad se caracterizaron en levaduras de gemación y de fisión, codificadas por los genes *pds1* y *cut2*, respectivamente (Hirano *et al.*, 1986; Yamamoto *et al.*, 1996). Ambas eran sustratos del complejo APC (*Anaphase Promoting Complex*) y se asociaban con las proteínas separasas (“Esp1” en *S. cerevisiae* y “Cut1” en *S. pombe*) (Funabiki *et al.*, 1996; Ciosk *et al.*, 1998). Por su función en el ciclo, y a pesar de no ser homólogas, las dos proteínas, PDS1 y CUT2, de levaduras se denominaron “inhibidores de anafase” o “securinas” (Toth *et al.*, 1999).

En 1999, tras el descubrimiento de las separasas y las securinas en levaduras, se identificaron proteínas de función análoga en vertebrados mediante estudios basados en analogía bioquímica, al no presentar homología significativa con ninguna de las securinas de levaduras, a pesar de existir secuencias conservadas entre ellas.

Ya que las securinas de levaduras funcionan uniéndose e inhibiendo a las separasas, el grupo del Prof. Kirschner (*Zou et al., 1999*) se basó en esta característica para buscar la securina humana. Llevaron a cabo experimentos de coimmunoprecipitación en los que analizaron proteínas asociadas a la proteína separasa de células HeLa S3 en metafase pero que no lo hacían en anafase (etapa en la que ya ha sido degradada la securina). Así, identificaron una proteína cuya secuencia coincidía exactamente con hPTTG. Tras este hallazgo, el gen *hpttg* se renombró como *hpttg/securina* pues su producto génico correspondía precisamente a la securina humana.

hPTTG/ Securina es hidrofílica y contiene una región amino-terminal (posición 58 a 101) rica en aminoácidos básicos (32% de residuos básicos, Lys, Arg) (*Zhang et al., 1999*), que es una característica de los sustratos del APC, posiblemente porque la lisina forma una unión isopeptídica covalente con la ubiquitina. Contiene también en su C-terminal dos motivos de unión a dominos SH-3 ($^{163}\text{P-P-S-P}^{166}$ y $^{170}\text{P-S-P-P}^{173}$), similares a los de la familia Src.

Los motivos C-terminales PXXP son esenciales para la funcionalidad de hPTTG (*Zhang et al., 1999; McCabe et al., 2002; Boelaert et al., 2004*). De forma similar a su homólogo humano, mutaciones en los aminoácidos del carboxilo terminal, P¹³⁹ y S¹⁵⁹, o en el motivo $^{157}\text{P-P-S-P}^{160}$ de PTTG de ratón, eliminan su funcionalidad (*Wang et al., 2000*). Es de destacar que existe una variante de ratón de 188 aminoácidos con un C-terminal diferente (GKGVRSNGCKDLVT) que no posee las capacidades funcionales de PTTG y que podría actuar como un competidor funcional endógeno de dicha PTTG silvestre (*Wang et al., 2000*).

Estudios con el gen de ratón han permitido identificar los dominios de unión al DNA (región comprendida entre el residuo 60 y el 118) y de transactivación (del residuo 119 al 164) de PTTG (*Pei 2000; Pei 2001*). El N-terminal contiene una caja de destrucción D (R⁶¹KALGTVN⁶⁸), que está conservada en humanos, rata y ratón, así como una caja KEN (en humanos) ó

KDN (en rata y ratón); estas cajas están implicadas en la degradación de la proteína por el proteosoma (*Sou et al., 1999*).



Figura III. Alineamiento de las secuencia de securinas de vertebrados. Securina humana (hSec) es idéntica a hPTTG. Las secuencias de la securina de ratón (mSec) y de rata (rSec) se han obtenido de la base de secuencias *GenBank* (AF069051 y U73030, respectivamente). La Securina de *Xenopus* se indica como xSec. Los residuos idénticos o conservados en las cuatro proteínas se marcan en negro. Las cajas de destrucción D y KEN/ KDN están marcadas en violeta (*Zou et al., 1999*).

5. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE hPTTG

5. 1. Fosforilación de hPTTG

Tanto PTTG como hPTTG migran en SDS-PAGE como un doblete, debido a que se fosforilan y esta fosforilación es dependiente del ciclo celular (*Pei. et al., 1997; Sou et al., 1999; Ramos-Morales et al., 2000; Romero et al., 2001*), concretamente de la transición G2/M (*Ramos-Morales et al., 2000*). Si se tratan extractos celulares con inhibidores de fosfatasa, aparecen en el gel varias bandas retardadas, que representan formas fosforiladas de hPTTG (*Gil-Bernabé et al., 2006*). La quinasa CDK1/Cdc2 fosforila el residuo Ser¹⁶⁵, que está conservado en humanos, rata y ratón (*Ramos-Morales et al., 2000*). El

residuo Ser¹⁶⁵ está localizado entre los dos motivos ricos en prolina C-terminales, esenciales para la actividad transcripcional de hPTTG, sugiriendo que esta fosforilación podría ser necesaria para la actividad funcional de hPTTG (*Ramos-Morales et al., 2000*).

En rata, el residuo Ser¹⁶² es fosforilado por MAPK, una quinasa implicada en la activación mitótica, y esta fosforilación juega un papel esencial en la localización y en la función de transactivación de PTTG (*Pei, 2000*). Además, se han identificado al menos 6 sitios potenciales de fosforilación por la DNA-PK (S/T-Q ó P-S/T) en hPTTG. La DNA-PK es un complejo quinasa formado por una subunidad catalítica y dos subunidades reguladoras, Ku-70 y Ku-80, que responde a daños en el DNA. Se ha demostrado que la subunidad catalítica de este complejo fosforila *in vitro* a hPTTG. No se conoce con seguridad el sitio de fosforilación ni su significado biológico, pero no tiene efectos sobre la asociación de hPTTG con Ku-70 (*Romero et al., 2001*).

PTTG1 posee, además, en su secuencia sitios consenso para la fosforilación por quinasas dependientes de AMPc y GMPc, caseín-quinasa II y proteína-quinasa C (*Domínguez et al., 1998*).

Se desconocen las fosfatasas que participan en la regulación de hPTTG, pero recientemente se ha demostrado la implicación de PP2A en este proceso (*Gil-Bernabé et al., 2006*). Según los últimos datos obtenidos por nuestro grupo de investigación, el nivel de fosforilación de hPTTG podría afectar a la estabilidad de la proteína, la cual estaría sometida, bajo ciertas condiciones de estrés, a degradación por el sistema SCF de la célula, que depende necesariamente de sustratos fosforilados. El trabajo publicado por Spinette y colaboradores apoya esta hipótesis; demuestran que hPTTG es un sustrato de la proteína Ufd2, una enzima E4 que cataliza la adición de cadenas de multiubiquitinas a proteínas previamente fosforiladas. Por tanto, es posible que la estabilidad de hPTTG esté controlada por más de un sistema de degradación (*Spinette et al., 2004*).

5. 2. Ubiquitinación de hPTTG

hPTTG es rápidamente degradada por el proteosoma al final de la metafase para asegurar la separación correcta de las cromátidas hermanas (Sou *et al.*, 1999), como también ocurre en *S. cerevisiae* con Pds1 (Cohen-Fix *et al.*, 1996), en *S. pombe* con Cut2 (Funabiki *et al.*, 1996), y en *Drosophila* con Pim1 (Leismann *et al.*, 2000). Dicha degradación es resultado de la ubiquitinación por APC (Zur *et al.*, 2001), un complejo con actividad ubiquitinligasa de elevado peso molecular compuesto por varias subunidades diferentes que, a la vez que promueve la separación de las cromátidas mediante la degradación de las moléculas de securina, también inactiva la proteína CDK1/Cdc2 por degradación de las ciclinas mitóticas (A y B).

Las ciclinas caracterizadas hasta el momento son degradadas por el proteosoma (Nakayama *et al.*, 2006). En el caso de las ciclinas mitóticas, el sistema encargado de marcarlas con la cadena de poliubiquitinas es el APC, que actúa junto con la enzima E1 (activadora universal de ubiquitina), una enzima conjugadora de ubiquitinas, y un cofactor que se une y actúa de forma secuencial y que es necesario para su actuación: Cdc20 ó Cdh1 (según los casos).

El APC reconoce dos motivos en el sustrato conocidos como cajas de destrucción o D-box (RXXLXXXXN) y KEN-box (KEN) (Glotzer *et al.*, 1991; Pflieger y Kirschner, 2000). Las cajas D se identificaron en un principio en el extremo N-terminal de las ciclinas mitóticas mientras que la caja KEN se encontró en el activador del APC, Cdc20. Todos los sustratos del APC poseen una o las dos cajas mencionadas. Cdc20 y Cdh1 dirigen la degradación de sustratos que contienen el motivo D-box, aunque Cdh1 también reconoce proteínas con la caja KEN (Pflieger y Kirschner, 2000).

En contraste a Pds1, cuya degradación por el proteosoma es dependiente de Fzy/Cdc20 (siendo la degradación de las ciclinas mitóticas

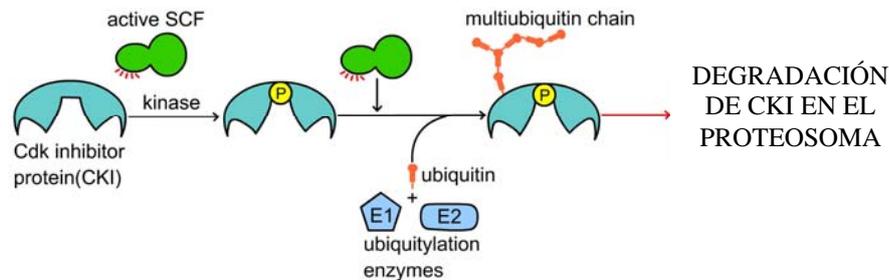
catalizada por APC^{Fzr}), la degradación de hPTTG es catalizada por ambas proteínas Fzy (Fizzy/Cdc20) y Fzr (Fizzy-related/Cdh1/ Hct1) (Zur. *et al.*, 2001). La degradación de hPTTG es dependiente de sus dos cajas de destrucción D y KEN, en contraste con la securina de *Xenopus*, en la que mutaciones únicamente en su caja D impiden su degradación (Sou *et al.*, 1999). Las mutaciones de la caja D ó KEN por separado no inhiben, o si lo hacen sólo es parcialmente, la degradación de hPTTG (Zur *et al.*, 2001).

Numerosas proteínas son llevadas a la vía de degradación por el proteosoma 26S mediante la familia de ubiquitín-ligasas E3. El complejo SCF ligasa, que interviene en la ubiquitinación de proteínas implicadas en procesos tan distintos como regulación del ciclo celular, transcripción o transducción de señales (Peters, 1998; Harper, 2002), está compuesto por las subunidades **Skp1**, **Cul1** y **F-box**. El reclutamiento de los sustratos por dicho complejo ocurre a través de una de las muchas proteínas F-box que funcionan como moléculas adaptadoras (Winston *et al.*, 1999). Las proteínas F-box interaccionan vía el motivo que lleva su nombre con la subunidad Skp1, que hace de puente entre la primera y la subunidad Cul1. El reconocimiento del sustrato por la proteína F-box está mediado en la mayoría de los casos por fosforilación de sus proteínas diana (Harper, 2002).

El sistema SCF parece estar implicado en la proteólisis de las formas fosforiladas de securina, de manera que la abundancia de hPTTG en la célula no sólo estaría regulada por el complejo APC en metafase (APC^{Cdc20}) y salida de mitosis (APC^{Cdh1}) sino también por el sistema SCF en otras fases del ciclo celular y tras el daño en el DNA (Gil-Bernabé *et al.*, 2006). Estas dos formas de degradación han sido descritas para la fosfatasa CDC25A. Mientras que el APC interviene en el mecanismo de degradación de CDC25A durante la salida de mitosis, el sistema SCF regula su abundancia en las fases S y G2 del ciclo. Además, en respuesta al daño en el DNA o a fallos en la replicación, la activación de las quinasas ATM y ATR conlleva la activación de Chk1 y Chk2 y

la hiperfosforilación de CDC25A, que estimula su propia ubiquitinación por las proteínas SCF y su degradación (*Busito et al., 2004; Donzelli et al., 2002*).

(a) Control de la proteólisis por el sistema SCF



(b) Control de la proteólisis por el APC

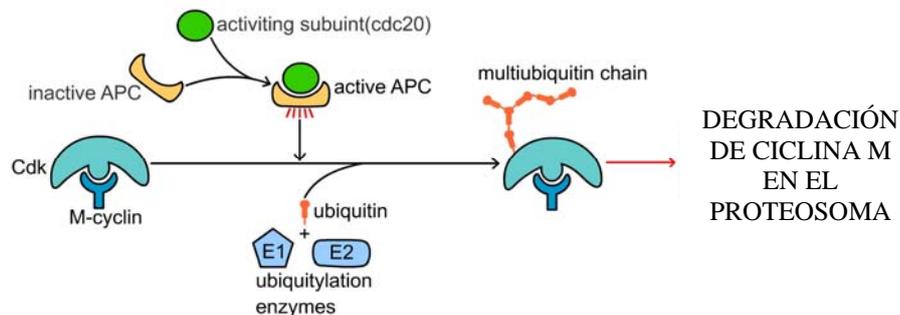


Figura IV. Actuación diferencial de los complejos ubiquitín-ligasas SCF (a) y APC (b). SCF depende de sustratos fosforilados.

6. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE hPTTG

Se han publicado datos contradictorios sobre la localización subcelular de hPTTG, existiendo diferencias en cuanto a su localización citoplásmica o nuclear, debidas probablemente al uso de sistemas celulares y/o técnicas diferentes. Aunque el papel fisiológico de la localización citoplásmica de hPTTG no está claro, la localización nuclear observada concuerda con sus funciones de activador transcripcional y de securina.

La proteína hPTTG se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo (*Zhang et al., 1999; Domínguez et al., 1998; Sáez et al., 1999; Yu et al., 2000; Chien et al., 2000; Stratford et al., 2005*); sin embargo, la proporción de proteína citoplásmica versus nuclear no está clara. La proteína hPTTG en células Jurkat es principalmente citoplásmica (85%) como se ha determinado por subfraccionamiento celular (*Domínguez et al., 1998*). Esta localización citoplásmica predominante se ha observado también en una serie amplia de adenomas de hipófisis humanos por inmunohistoquímica (*Zhang et al., 1999; Sáez et al., 1999*). La localización nuclear de hPTTG se ha observado en algunos tumores, mientras que no se ha detectado la proteína en tejidos normales de hipófisis (*Sáez et al., 1999*); en el trabajo referenciado, 14 de 18 adenocarcinomas de mama y 9 de 10 adenocarcinomas de pulmón mostraban immuno-reactividad principalmente citoplásmica; sin embargo, en aquellos tumores más agresivos, se observaba un fuerte marcaje nuclear (*Sáez et al., 1999*). También se ha observado una localización predominantemente citoplásmica en células HCT116 transfectadas con hPTTG fusionada a GFP (*Stratford et al., 2005*).

Sin embargo, las células JEG-3, que poseen niveles bajos de hPTTG, transfectadas con tres construcciones diferentes de hPTTG (silvestre, fusionada a FLAG y fusionada a GFP), mostraban localización nuclear en interfase (*Yu et al., 2000*). Es significativo que en algunas células (<5%), hPTTG también se ha localizado en la membrana plasmática (*Yu et al., 2000*). La localización nuclear de hPTTG se ha observado independientemente del nivel de expresión de la proteína transfectada y se ha confirmado en diversas líneas celulares (fibroblastos de ratón NIH3T3, línea de tumor de hipófisis de rata GH3 y de ratón AtT20, línea de cáncer de ovario humano SKOV-3 y células de riñón de mono COS-7). En el mismo estudio, imágenes tomadas *in vivo* de la construcción hPTTG-GFP durante mitosis revelaron co-localización de hPTTG con microtúbulos del áster en profase y prometafase, agregados en distintos gránulos durante anafase y disminución de la expresión en telofase (*Yu et al., 2000*). Mu y sus colaboradores observaron una distribución subcelular de hPTTG dependiente del tipo celular, que era predominantemente

nuclear en células HeLa, COS-7 y DU145, pero que tenía una localización difusa nuclear y citoplásmica en células A549, DLD-1 y NIH3T3 (*Mu et al., 2003*).

Aunque la molécula de hPTTG no posee una señal de localización nuclear (NLS), podría entrar en el núcleo debido a su pequeño tamaño. Además, se ha identificado un factor de unión a hPTTG, denominado PBF (*PTTG-Binding Factor*), que facilitaría su translocación al núcleo (*Chien et al., 2000*). PBF es una proteína de 22 KDa expresada en diferentes tejidos, que contiene una NLS entre los aminoácidos 149 y 166 en el extremo carboxilo (*Chien et al., 2000*). Células COS-7 transfectadas con la proteína completa PBF fusionada a un péptido de la hemaglutinina (HA), mostraban localización nuclear principalmente, mientras que un mutante deletado en el motivo NLS mostraba un patrón predominantemente perinuclear y citoplásmico (*Chien et al., 2000*).

Ensayos de *binding in vitro* de la proteína fusionada a GST y estudios de inmunoprecipitación han demostrado que hPTTG interacciona específicamente con PBF y que en dicha interacción es esencial la región comprendida entre los aminoácidos 123 y 154 del extremo carboxilo de hPTTG, y la región carboxilo de PBF (*Chien et al., 2000*). Además, la localización fundamentalmente citoplásmica de hPTTG-GFP llega a ser predominantemente nuclear cuando se sobreexpresa conjuntamente con el factor PBF (*Chien et al., 2000*). PBF también parece ser importante para la actividad transcripcional de hPTTG (*Chien et al., 2000*). Sin embargo, en células HCT116 transfectadas con hPTTG-GFP, donde la localización es fundamentalmente citoplásmica, la co-transfección con PBF unida a HA no resulta en una relocalización al núcleo, sino que existe co-localización de ambas proteínas en el citosol (*Stratford et al., 2005*).

Independientemente de su interacción con PBF, se ha propuesto que la fosforilación por MAP quinasa quinasa (MEK1) es un mecanismo adicional para la activación y traslocación nuclear de PTTG. Este mecanismo requiere la

interacción directa de PTTG con MEK1 mediante el motivo SH3 localizado entre los residuos 51 y 54, y esta interacción es además crucial para la función transactivadora de PTTG (*Pei, 2000*).

Recientemente, Minematsu y sus colaboradores han demostrado por estudios inmunohistoquímicos que hPTTG se localiza en el citoplasma de las células tumorales de hipófisis. Estudios de microscopía confocal de adenomas de hipófisis humanos y microscopía electrónica de la línea de hipófisis de ratón AtT-20, han demostrado la localización de PTTG en el aparato de Golgi y en las vesículas citosólicas. Estos autores proponen que PTTG es una proteína que se secreta al medio extracelular en las líneas tumorales de hipófisis y que podría funcionar como un regulador autocrino y paracrino importante para las células del tumor (*Minematsu et al., 2007*).

7. FAMILIA GÉNICA DE hPTTG

7. 1. Clonación y caracterización de *pttg2* y *pttg3*

En 1999 (*Prezant et al., 1999*) se publicó la existencia de una isoforma del gen humano *hpttg*. Mediante la amplificación de DNA genómico con cebadores degenerados de *hpttg* se identificó un gen homólogo, denominado *pttg2*, que no contenía intrones y mapeaba en el cromosoma 4p15.1 (*Prezant et al., 1999; Chen et al., 2000*). El análisis de su secuencia (*GenBank AF116538*) reveló un 94% de homología con el gen *hpttg* y un 91% de identidad a nivel de aminoácidos. Con el descubrimiento de esta isoforma, la denominación *hpttg* se sustituyó por *pttg1*, que utilizaremos a partir de ahora. La secuencia codificante de *pttg2* da lugar a una proteína de 191 aa, en la que los últimos 11 residuos son específicos de esta isoforma debido a un cambio en la pauta de lectura que tiene lugar en la región C-terminal de la proteína. PTTG2 también contiene dos motivos ricos en prolina conservados en su extremo C-terminal.

La observación de múltiples polimorfismos en una región de *pttg2* de tino normal sugirió la existencia de una tercera isoforma de *pttg1* (*Prezant et al., 1999*). Chen y sus colaboradores (*Chen et al., 2000*) confirmaron la existencia de la isoforma *pttg3*, que tampoco contenía intrones y que mapeaba en el cromosoma 8q13.1. *Pttg3* contenía una secuencia codificante de 606 pb (al igual que *pttg2*) y daba lugar a una proteína de 202 aminoácidos, con un 89 y 84% de identidad a *Pttg1* y *Pttg2* respectivamente. En su secuencia estaban presentes los dos motivos ricos en prolina conservados en su C-terminal (*Chen et al., 2000*).

```

1                                     60
MATLIYVDKENGEPGTRVVAAKDGLKLGSGPSIKALDGRSQVSTPRFGKTFDAPPALPKAT
MATLIYVDKENEEPG I LV A TKDGLKLGSGPSIKALDGRSQVS I SCFGKTFDAPTSLPKAT
MATLIYVDKE IGEPGTRV A A KDVLKLESRPSIKALDG I SQVLT PRFGKTYDAPSALPKAT

61                                     120
RKALGTVNRATEKSVKTKGPLKQKQPSFSAKKMTEKTVKAKSSVPASDDAYPEIEKFFPF
RKALGTVNRATEKSVKTNGPLKQKQPSFSAKKMTEKTVKAKNSVPASDDGYPEIEKLFPPF
RKALGTVNRATEKSVKTNGPRKGKQPSFSAKKMTEKTVKTKSSVPASDDAYPEIEKFFPF

121                                     180
NPLDFESFDLPEEHQIAHLPLSGVPLMILDEERELEKLFQLGPPSPVKMPSPPWESNLLQ
NPLGFESFDLPEEHQIAHLPLSEEVPLMILDEERELEKLFQLGPPSPLKMPSPPWKSNLLQ
NLLDFESFDLPEERQIAHLPLSGVPLMILDEEGELEKLFQLGPPSPVKMPSPPWECNLFA

181                                     202
SPSILSTLDVELPPVCCDIDI → PTTG1
SPLSILLTLDVELPPVCCDIDI → PTTG3
VSFKHSVDPGC → PTTG2
191
    
```

Figura V. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de PTTG1, PTTG2 y PTTG3. La secuencia de PTTG2 tiene un cambio en la pauta de lectura, que genera una proteína de 191 residuos en vez de 202. La caja de destrucción D está conservada en las tres proteínas de la familia, mientras que la caja KEN se pierde en PTTG2 (subrayadas en rojo).

7. 2. Patrón de expresión de los miembros de la familia de *pttg1*

Análisis de *northern blot*, empleando sondas específicas que no presentaban hibridación cruzada entre sí, revelaron que existían niveles bajos de mRNA de *pttg2* en testículo, ovario, bazo, próstata, intestino delgado y

colon, pero no había expresión alguna en timo ni en leucocitos del sistema sanguíneo periférico (*Chen et al., 2000*). Mediante RT-PCR, técnica más sensible que la anterior, se detectó además el mensajero de *pttg2* en hipófisis, hígado, y en las líneas celulares de los tumores correspondientes a dichos tejidos (*Prezant et al., 1999; Chen et al., 2000*).

Sin embargo, *pttg3* sólo se ha detectado, mediante RT-PCR, en tumores de ovario y en las líneas celulares SKOV3 y PAI, derivadas de dicho tumor (*Chen et al., 2000*). Posteriormente, se ha descrito que tanto *pttg3* como *pttg1* se expresan en oocitos humanos y que su expresión aumenta durante la maduración de dichos oocitos (*Assou et al., 2006*).

8. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE PTTG1

8. 1. Función de securina

La célula eucariótica se distingue de la célula procariota en la capacidad de retrasar la segregación de sus cromosomas tras la duplicación. La separación temporal de la duplicación del DNA y la segregación cromosómica implica la cohesión entre las cromátidas hermanas desde la fase S. A pesar de la importancia de la cohesión entre las cromátidas hermanas para el correcto desarrollo de la mitosis, los mecanismos responsables de la cohesión no se han conocido hasta hace muy pocos años (*Biggins y Murray, 1999; Nasmyth et al., 2000*).

Mediante un estudio genético en levaduras para la búsqueda de proteínas implicadas en la cohesión de las cromátidas hermanas, se identificaron más de una docena de estas proteínas. Cuatro de ellas, Smc1, Smc3, Scc1 (Mcd1, Rad21) y Scc3 forman el complejo soluble denominado “cohesina” en levaduras (*Guacci et al., 1997; Michaelis et al., 1997; Toth et al., 1999*), gusanos (*Chan et al., 2003*) y vertebrados (*Darwiche et al., 1999; Losada et al., 1998*). Éstos últimos expresan dos homólogos de Scc3 en células somáticas, llamados Stag1 y Stag2, y una variante de éstos, Stag3, en

células germinales (Stag3 es la cohesina específica de meiosis I en los espermatoцитos de ratón) (Prieto *et al.*, 2001).

Desde la fase S del ciclo hasta metafase, las cromátidas hermanas se mantienen unidas gracias al complejo cohesina (Tanaka *et al.*, 2000). Se han propuesto diferentes modelos en los que el complejo cohesina formaría un gran anillo uniendo las cromátidas hermanas (Haering, *et al.*, 2002; Gruber, *et al.*, 2003; Huang, *et al.*, 2005; Nasmyth, 2005; Yanagida, 2005).

Las subunidades Smc1 y Smc3 pertenecen a la familia SMC (**Structure Maintenance of Chromosomes**) presentes en la mayoría de los seres vivos. Las proteínas SMC parecen regular la morfología de los cromosomas, estando implicadas en la condensación de los cromosomas, recombinación, reparación y compensación de dosis génica, así como en la cohesión de las cromátidas hermanas. Poseen un elevado peso molecular (1000-1500 residuos) y se caracterizan por su diseño estructural único. Los dominios N y C-terminales de la molécula, llamados dominios de cabeza, son globulares y están separados por dos largas extensiones de regiones alfa-hélices anfipáticas, que están a su vez divididas por un tercer dominio globular. Este dominio orienta las alfa-hélices de manera que forman una hélice superenrollada intramolecular y antiparalela de unos 50 nm de longitud, que acerca los dominios terminales de la molécula (Melby *et al.*, 1998; Haering *et al.*, 2002; Hirano e Hirano, 2002). El dominio N-terminal contiene un motivo de unión de nucleótidos trifosfato, llamado *P-loop* o motivo *Walker A*. El motivo C-terminal contiene la caja *DA-box* de unión de ATP, denominado motivo *Walker B* (Walker *et al.*, 1982; Sayito *et al.*, 1994; Lowe *et al.*, 2001).

Al dominio central de dimerización se le denominó originalmente bisagra, pues tanto la micrografía electrónica como las medidas biofísicas sugerían que los dos brazos SMC emergían del dominio central con ángulos flexibles (Hirano *et al.*, 2001; Melby *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2002).

En procariotas, los dímeros de proteínas SMC contienen dos moléculas idénticas (homodímeros); sin embargo, en eucariotas se forman entre una molécula Smc1 y otra Smc3 (heterodímeros).

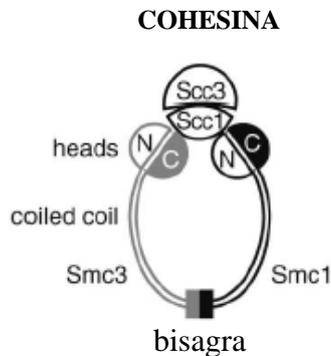


Figura VI. Modelo del anillo de cohesina en eucariotas (Weitzer et al., 2003).

Las proteínas Smc1 y Smc3 se asocian con las subunidades Scc1 y Scc3 para formar el complejo cohesina. Una quinta subunidad, Pds5, parece unirse más débilmente a dicho complejo (Hartman et al., 2000; Panizza et al., 2000; Sumara et al., 2000).

Numerosos datos apoyan el modelo según el cual la molécula Scc1 conectaría los dominios cabeza del heterodímero Smc3-Smc1, formando un gran anillo (Haering et al., 2002). Análisis bioquímicos de subcomplejos de cohesinas de levaduras muestran que el extremo N-terminal de Scc1 se une a la cabeza de Smc3 y el extremo C-terminal a la de Smc1. Por otro lado, los dominios N y C-terminales de Rec8 (variante meiótica de Scc1) se unen a las cabezas de Smc3 y Smc1 de manera similar a como lo hace su homólogo Scc1 (Gruber et al., 2003). La región central de Scc1 se une a Scc3, que, de este modo, queda incorporada al anillo.

Esta estructura en forma de anillo es consistente con la micrografía electrónica de cohesina monomérica soluble (Anderson et al., 2002) si bien no es un modelo probado definitivamente, pues, aunque en solución sean capaces de formar el anillo, se desconoce si también lo hacen *in vivo*.

El complejo cohesina mantendría la cohesión de las cromátidas “abrazándolas” el anillo. Con un diámetro de unos 35 nm, el anillo de cohesina sería suficientemente ancho como para rodear con facilidad dos fibras de cromatina de 10 nm, incluso empaquetadas en los nucleosomas (*Haering et al., 2002*).

Los estudios de inmunoprecipitación de cromatina sugieren que la cohesina no se encuentra al azar en el DNA, sino en lugares específicos conocidos como CARs (*Cohesin Associated Regions*), que mantienen una distancia entre sí de 5 a 10 Kb (*Blat y Kleckler, 1999; Megee et al., 1999; Tanaka et al., 1999; Laloraya et al., 2000*). La mayoría de los CARs están situados en las regiones intergénicas y transcripcionalmente inactivas; son secuencias ricas en AT, pero no parecen tener ninguna secuencia consenso.

A diferencia de lo que ocurre en levaduras, dos procesos distintos inducen la disociación de las moléculas de cohesina de los cromosomas durante la mitosis en células de mamíferos. El primero tiene lugar en profase e implica la fosforilación de la subunidades Scc3 por la enzima PLK1 (*polo-like kinase 1*) (*Sumara et al., 2002; Hauf et al., 2005*). El segundo proceso tiene lugar a comienzos de anafase e implica la rotura de Scc1 por la proteasa separasa (*Uhlmann et al., 1999*).

El descubrimiento de la separasa en levaduras tuvo lugar mediante un rastreo de mutantes de levaduras de fisión que no separaban sus cromosomas en mitosis y presentaban una distribución desigual de la masa de DNA. Se denominó Cut1 (*Cell untimely torn*) por el fenotipo característico que presentaba. Sus ortólogos en levaduras de gemación (Esp1) y *Aspergillus* (BimB) presentaban poca identidad de secuencia, pero el fenotipo resultante de su delección era similar (*Uzawa et al., 1990; McGrew et al., 1992*).

Las separasas son endopeptidasas de cisteínas de elevado peso molecular (150-230 KDa, dependiendo de la especie). El dominio C-terminal de aproximadamente 50 KDa, “dominio separasa”, está muy conservado y

contiene el sitio proteolítico; son residuos Cys e His conservados que definen su sitio activo y que son compartidos por todas las proteasas de tipo CD, familia a la que pertenecen también las caspasas (*Uhlman et al., 2000; Aravind et al., 2002*). En esta región carboxilo existe un sitio de unión de Ca^{2+} , catión que parece afectar a su actividad (*Kumada et al., 1998; Jensen et al., 2001*).

La región N-terminal no está conservada entre las distintas especies y contiene sitios importantes para el tráfico celular de la proteína y para su interacción con securina (*Funabiki et al., 1996; Ciosk et al., 1998; Kumada et al., 1998; Jensen et al., 2001*). En levaduras de fisión, esta región se ha relacionado con la localización nuclear de la separasa, mientras que la zona central gobernaría su retención en el citoplasma (*Kumada et al., 1998*). La región N-terminal es también responsable de su unión con la securina (*Funabiki et al., 1996; Ciosk et al., 1998; Jensen et al., 2001*). El hecho de que exista una gran diversidad de secuencia en las securinas de los diferentes organismos explicaría por qué este dominio está poco conservado.

Durante la mayor parte del ciclo celular, la securina está unida a la separasa, inhibiendo su actividad proteolítica (*Ciosk et al., 1998; Uhlmann et al., 1999; Horing et al., 2002; Waizenegger et al., 2002*). Dicha actividad está también inhibida en vertebrados, de forma redundante, por fosforilación dependiente del complejo CDK1-ciclina B (*Stemmann et al., 2001; Nasmyth, 2005*). Esta fosforilación tiene lugar en la Ser1126, un aminoácido que se localiza en la zona central de la separasa, lejos del residuo catalítico Cys2029. Además de esta fosforilación implicada en su inhibición, tiene lugar una segunda en el residuo Thr1346.

Células madre embrionarias de ratón a las cuales se les ha eliminado el gen securina son viables y mantienen la cohesión de sus cromátidas hermanas en respuesta a drogas que desorganizan los microtúbulos (nocodazol). Sin embargo, estas mismas células con el gen separasa mutado en el residuo Ser1126 (Ser1126Ala) son viables pero incapaces de mantener la cohesión de

las cromátidas, mostrando una mayor sensibilidad a nocodazol (*Huang et al., 2005*).

En la transición de metafase a anafase, una vez que el proceso de bi-orientación de los cromosomas se ha completado, se inicia la degradación de securina y de ciclina B por el proteosoma gracias a que son ubiquitinadas por el complejo APC. La destrucción de securina libera a la separasa, que media entonces la proteólisis de las moléculas de cohesina (*Wirth et al., 2006*), posibilitando la separación equitativa de las cromátidas hermanas a las células hijas.

La activación de la separasa coincide con su propia escisión en dos fragmentos, existiendo sitios de auto-rotura conservados en las distintas especies (*Waizenegger et al., 2002; Zou et al., 2002*).

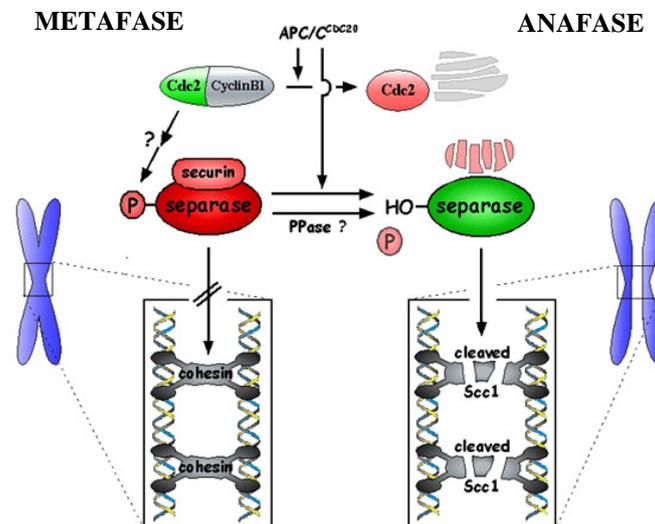


Figura VII. Modelo para la separación de las cromátidas hermanas en anafase. El complejo cohesina mantiene la cohesión entre las cromátidas hermanas hasta que la subunidad Scc1 es digerida por la separasa. Este hecho ocurre una vez que la separasa se libera de la securina, en la transición metafase-anafase. La pérdida de cohesión entre las cromátidas marca el comienzo de su segregación.

El APC controla, por tanto, el inicio de la anafase al modificar para su degradación a dos proteínas claves en la regulación de la separasa: securina y ciclina B, cofactor de la quinasa cdc2 que fosforila el residuo Ser1126.

En levaduras de gemación, la actividad proteolítica de la separasa requiere la interacción de su extremo N-terminal con el sitio activo, situado en el C-terminal, que dista unos 1500 aminoácidos. La securina, al unirse a la separasa, impide que esta interacción se lleve a cabo, ya que se interpone entre ambos extremos. Una vez degradada la securina, los extremos N- y C-terminales están próximos, permitiendo a la separasa desarrollar su actividad proteolítica. La proteína securina actúa como chaperona, impidiendo un cambio conformacional que le permite ser activa proteolíticamente (*Hornig et al., 2002*).

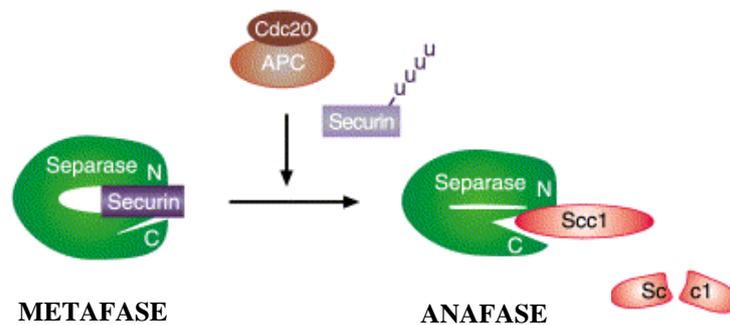


Figura VIII. Modelo de actuación de Separasa y de inhibición por Securina. Securina se une a ambos extremos N y C-terminal de separasa, impidiendo tanto la interacción de dichos extremos entre sí como el acceso a Scc1 (*Hornig et al., 2002*).

8. 2. Reparación del daño al DNA

Para asegurar la integridad del material genético y la supervivencia, las células eucarióticas responden al daño en el DNA retrasando o parando el ciclo celular para posibilitar la reparación eficaz del DNA o bien, si el daño es considerable inducir apoptosis o senescencia en la célula. Estos mecanismos

se llevan a cabo a través de una red de rutas de señalización conocida como puntos de control del ciclo celular (*Lukas et al., 2004*).

Los componentes de esta red se agrupan en cinco categorías, que se relacionan a continuación: sensores, como el complejo Rad9/Hus1/Rad1, o el MRN (Mre11/Rad50/Nbs1); adaptadores, como BRCA1, NFB1/MDC1, 53BP1; quinasas apicales transductoras de señales, como ATM/ATR o PI3K; quinasas efectoras de Ser/Thr, como Chk1 y Chk2; y proteínas efectoras o dianas como CDC25, proteínas de reparación del DNA, factores de transcripción (E2F, p53...) o componentes de la cromatina y reguladores como la histona H2AX (*Barket y Lukas, 2003; Donzelli y Draetta, 2003; Siloh, 2003; Lukas et al., 2004*).

La primera prueba de que PTTG1 podría estar implicada en la respuesta de la célula a daños en el DNA fue el descubrimiento de su interacción, tanto *in vitro* como *in vivo*, con Ku-70, una de las subunidades de DNA-PK que posibilita la unión al DNA de esta quinasa nuclear dependiente de daños en el DNA (*Romero et al., 2001*). La subunidad Ku-70 se asocia con otra, Ku-80, formando un heterodímero que constituye la parte reguladora del complejo enzimático. La subunidad catalítica de dicho complejo es la DNA-PKcs.

DNA-PK está implicada en la reparación de roturas de doble cadena en el DNA mediante el mecanismo NHEJ (*Non-Homologous End Joining*). Estas roturas pueden estar provocadas por radiación ionizante, reacciones de oxidación fisiológicas, drogas que afectan a la maquinaria de replicación, recombinación V(D)J en el caso de los linfocitos B, determinados productos quimioterapéuticos, etc. Ku participa también en el mantenimiento de la estabilidad de los telómeros (*Hsu et al., 2000; d'Adda di Fagagna et al., 2001*).

PTTG1 no sólo interacciona sino que es sustrato, al menos *in vitro*, de DNA-PK. La interacción PTTG1/Ku-70 está regulada por la cadena de DNA, de forma que la presencia de extremos libres de doble cadena no sólo impide la formación de complejos nuevos entre estas dos proteínas sino que rompe los

ya establecidos. Estos resultados sugieren que PTTG1 podría conectar las rutas de respuesta a daño en el DNA con la separación de las cromátidas hermanas.

Según un modelo propuesto, cuando se produce una rotura de doble cadena en el DNA, Ku se une con mayor afinidad y estabilidad al DNA dañado y recluta a la subunidad catalítica de DNA-PK, iniciándose la reparación del DNA dañado. Al mismo tiempo, PTTG1 se disocia de Ku y es fosforilada por el complejo enzimático de manera que se crea una proteína PTTG1-P más estable (no degradable por el sistema APC-proteasoma) que bloquearía la separación de las cromátidas hermanas mientras se repara el DNA (*Romero et al., 2001*).

Recientemente, del grupo de la Dra. M. Tortolero ha puesto de manifiesto que PTTG1 está implicada en la respuesta de la célula a los daños en el DNA por radiación. En este caso, y a diferencia de los datos obtenidos en levaduras donde securina se estabiliza, el daño en el DNA por radiación gamma y ultravioleta induce una reducción rápida de los niveles de PTTG1. A pesar de esta caída en los niveles de proteína, los complejos securina-separasa se mantienen, impidiendo la separación prematura de las cromátidas hermanas tras el daño. Además, PTTG1 es necesaria para mantener una parada del ciclo tras radiación UV, ya que células carentes de securina siguen proliferando tras la radiación, dando lugar a un aumento en el nivel de apoptosis (*Romero et al., 2004*).

Nuestro grupo ha demostrado también que la ausencia de PTTG1 afecta a la integridad del genoma y a la supervivencia de las células tras daños que provocan rotura de doble cadena en el DNA. En células provenientes de carcinoma de colon humano (HCT116) en donde se ha delecionado el gen *pttg1*, la sensibilidad a estos agentes genotóxicos es mayor que en las células parentales silvestres. Dicha línea HCT116 *pttg1*^{-/-} presenta un patrón de reparación distinto a la línea control y acumula graves aberraciones cromosómicas, como traslocaciones y fusiones cromosómicas, confirmándose

su implicación en la estabilidad cromosómica tras daños en el DNA (*Bernal et al., 2008*).

Otro hecho muy significativo que conecta PTTG1 con la respuesta al daño en el DNA es su interacción con p53, el supresor tumoral por excelencia en mamíferos. La interacción se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* y está mediada por la región N-terminal de PTTG1 y los aminoácidos 300-374 de p53 (región C-terminal). La interacción con p53 disminuye la capacidad de p53 para unirse al DNA, así como su actividad transcripcional. La relevancia fisiológica de esta interacción se ha puesto de manifiesto en células carentes de PTTG1 en las que tanto la transactivación como la apoptosis dependientes de p53 aumentan en comparación con la línea control (*Bernal et al., 2002*).

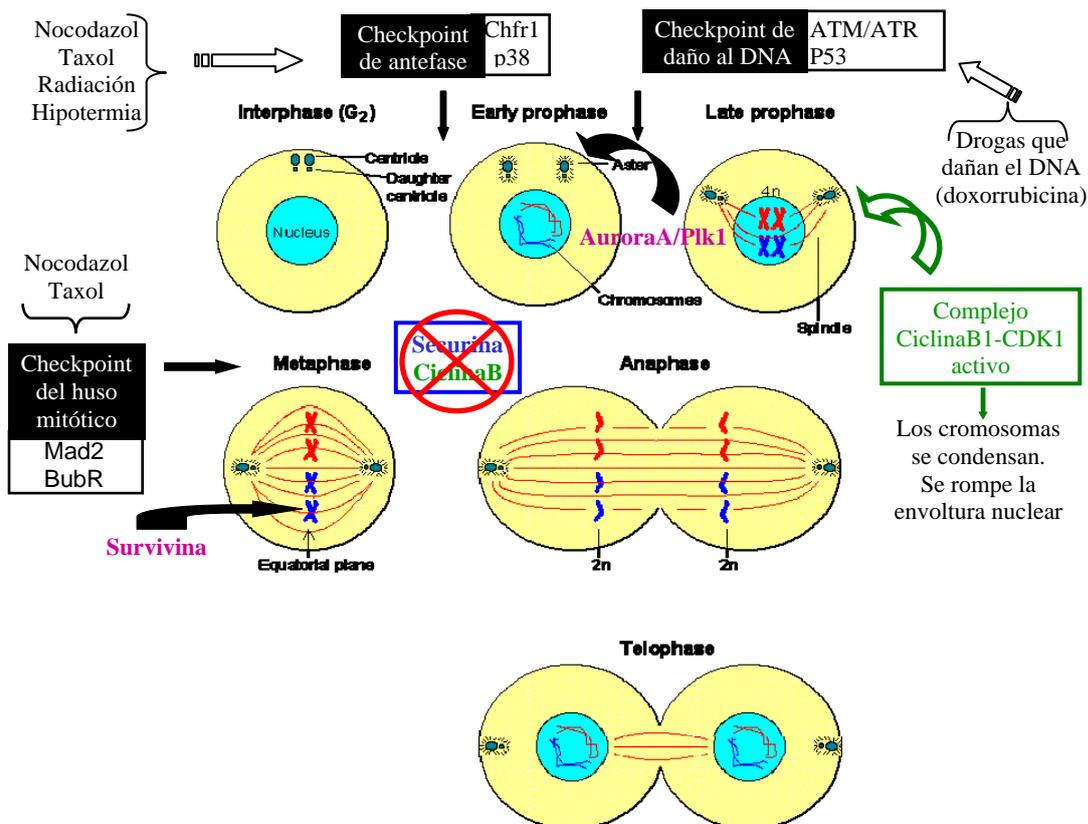


Figura IX: Esquema de las diferentes etapas del ciclo celular. Se marcan los puntos de control (*checkpoints*) más relevantes y las proteínas que intervienen.

8. 3. Actividad transactivadora

La estructura de PTTG1 y, particularmente, su dominio ácido C-terminal, que en muchos factores de transcripción eucariotas se relaciona con el dominio de transactivación (*Ptashne, M. 1988*), así como su localización parcial en el núcleo, llevó a proponer que PTTG1 podría tener capacidad transactivadora (*Domínguez et al., 1998*). De hecho, el fragmento C-terminal de PTTG1 activa la transcripción de los genes *his3* y *lacZ* en levaduras de gemación HF7c, así como del gen luciferasa en células de mamífero, cuando se fusionan a elementos de respuesta a GAL4 (*Domínguez et al., 1998*).

Análisis de mutagénesis y delección de la región C-terminal de PTTG1 indican que los residuos P¹³⁹, S¹⁵⁹, P¹⁵⁷-P-S-P¹⁶⁰ y L¹²⁰-D-F-D-L¹²⁴ son sitios de contacto críticos para su capacidad de transactivación (*Wang et al., 2000*). Ensayos de expresión transitoria de construcciones que contienen el dominio de unión al DNA de GAL4 y diferentes fragmentos de PTTG1 indican que el dominio de transactivación se localiza entre los aminoácidos 119 y 164 (*Pei, 2000*).

Como se ha indicado, la proteína PTTG de rata contiene un sitio consenso de fosforilación por MAPK (P-X-S/T-P) dentro del dominio de transactivación y se fosforila *in vitro* por dicha quinasa en el residuo S¹⁶², crítico para su función de transactivación (*Pei, 2000*). PTTG interacciona directamente con MEK1 a través del motivo de unión a dominos SH3 localizado entre los aminoácidos 51 y 54 de la molécula, y esta interacción es necesaria para mediar los efectos de MAPK sobre la actividad de transactivación de PTTG (*Pei, 2000*).

Mediante *arrays* de cDNA inicialmente se describieron 5 genes cuya expresión aumenta más de dos veces tras la inducción de *pttg1*. Estos genes son el oncogén *c-myc*, la proteína-quinasa C β-1, MEK1, MEK3 y la proteína de

choque térmico HSP70 (Pei, 2001). Estudios sobre los efectos de inducción de *c-myc* han revelado que PTTG1 activa su transcripción en células transfectadas y que se une al promotor de este oncogén cerca del sitio de inicio de la transcripción, formando parte de un complejo proteico en el que está presente el factor USF1 (Pei, 2001). También se ha identificado la región de PTTG1 implicada en la unión al DNA, que comprende la región desde el aminoácido 60 al 118, y se ha demostrado que es necesaria su unión al DNA para su actividad transcripcional (Pei, 2001).

Otra diana de PTTG1 es el factor angiogénico y mitogénico FGF-2. Tanto PTTG1 como FGF-2 están sobreexpresados en hipófisis (Heaney *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999; McCabe *et al.*, 2003), tiroides (Boelaert *et al.*, 2003), tumores de ovario (Puri *et al.*, 2001) y miomas uterinos (Tsai *et al.*, 2005). Experimentos *in vitro* han demostrado la inducción del gen *fgf-2* por sobreexpresión de PTTG1 en diferentes tipos celulares, incluyendo células NIH3T3 (Zhang *et al.*, 1999; Ishikawa *et al.*, 2001), células de tiroides (Boelaert *et al.*, 2004), células neuronales fetales humanas NT2, células JEG-3 y MCF-7 (McCabe *et al.*, 2002).

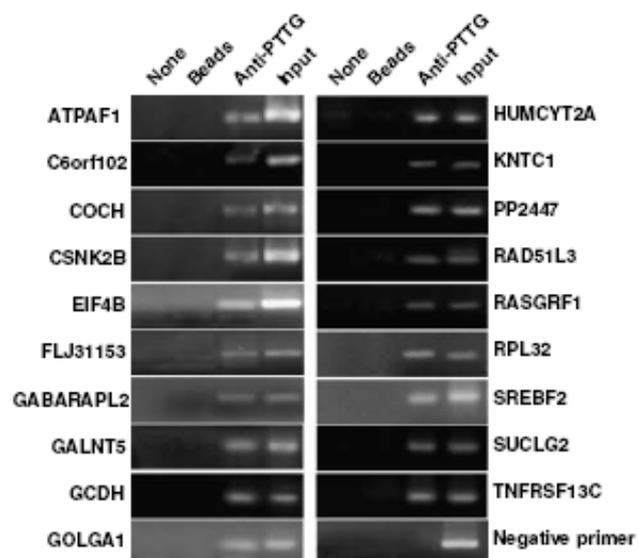
PTTG1 y, particularmente, su región carboxilo-terminal (aminoácidos 147-202), regula también la expresión hormonal hipofisiaria (Horwitz *et al.*, 2003). En células GH3 lacto-somatotrofas de hipófisis transfectadas con el fragmento carboxilo-terminal de PTTG1 silvestre, disminuía aproximadamente 10 veces la expresión del mRNA prolactina (PRL) y la secreción de dicha hormona, comparado con células que sobreexpresaban el mismo fragmento con el motivo de unión a SH3 mutado (Horwitz *et al.*, 2003). En contraste con PRL, la expresión del mRNA GH (hormona de crecimiento) y su secreción en las mismas células GH3 aumentaba 4 veces (Horwitz *et al.*, 2003). Estos resultados se han confirmado mediante expresión transitoria del promotor del gen *prl* fusionado con el gen luciferasa, y los fragmentos de PTTG1 (Horwitz *et al.*, 2003).

8.4. Control de la transición G1/S

Recientemente se ha empleado la tecnología “ChIP-on-Chip” (inmunoprecipitación de cromatina) para determinar los promotores sobre los que actúa PTTG1 (*Tong et al., 2007*). De 746 promotores génicos que se enriquecían significativamente por inmunoprecipitación con anticuerpos frente a PTTG1, en torno a 600 han sido bien caracterizados (<http://biowulf.bu.edu/zlab/Promover/promoser.htm>) y agrupados en tres grupos funcionales principales: los implicados en ciclo celular, los que controlan el metabolismo y los de rutas de transducción de señales (*Tong et al., 2007*).

Empleando un algoritmo diseñado específicamente para descifrar los patrones de transcripción obtenidos por esta técnica, se ha comprobado que los genes dianas de PTTG1 poseen un enriquecimiento en sitios de unión para determinados factores de transcripción, especialmente el factor Sp1 (*Tong et al., 2007*). Se ha demostrado que PTTG1 interacciona físicamente con el complejo Sp1, y que dicho complejo regula la expresión de CCND3 y la transición G1/S.

Figura X. Genes seleccionados por Chip-on-Chip. La cromatina de células JEG-3 fue inmunoprecipitada con anticuerpos anti-PTTG1 y mediante PCR se detectó y confirmó el enriquecimiento de los promotores. Algunos de los más representativos se muestran en la figura (*Tong, Y. et al., 2007*).



El complejo PTTG1-Sp1 colocaliza con el promotor de la ciclina D3 (CCND3) en células JEG-3 y HCT116. La supresión de SP1 ó PTTG1 por iRNA resulta en una transición atenuada G1/S en células JEG-3, aumentando la fase G1 (Tong *et al.*, 2007). La co-transfección del iRNA de Sp1 y el plásmido de PTTG1 ó el iRNA de PTTG1 y el plásmido de Sp1, revierte los efectos de cada uno sobre el otro, indicando la implicación de PTTG1 y Sp1 en la regulación de la transición G1/S (Tong. *et al.*, 2007). La transfección de Sp1 induce el mensajero y la proteína CCND3, mientras que la co-transfección de los iRNAs de Sp1 y PTTG1 bloquea dicha inducción. Además, utilizando la línea HCT116 deficiente en p21 (HCT116^{p21-/-}), se ha demostrado que la regulación de la transición G1/S por PTTG1 es independiente de p21 (Tong *et al.*, 2007).

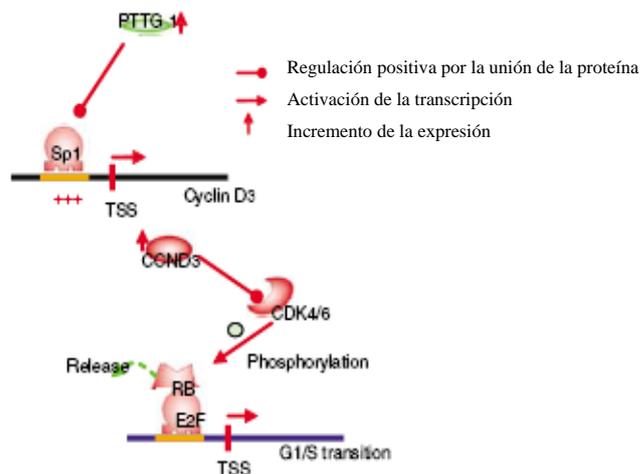


Figura XI. Regulación de la transición G1/S por PTTG1. La proteína PTTG1 induce el mRNA y la proteína ciclina D3. Esta ciclina interacciona con las quinasas CDK4 y CDK6; el complejo ciclina/quinasa fosforila al factor Rb, liberándose del factor de transcripción E2F que induce la expresión de los genes que regulan el paso de fase G1 a fase S (Tong, Y. *et al.*, 2007).

9. MECANISMOS TUMORIGÉNICOS DE PTTG1

9. 1. Inestabilidad cromosómica y aneuploidías

La capacidad de PTTG1 de transformar las células está bien establecida tanto *in vitro* como *in vivo*, como se muestra en la figura XII.

Un mecanismo importante de transformación celular por sobreexpresión de PTTG1 es la inducción de inestabilidad cromosómica y aneuploidía. Células de osteosarcoma MG-63 deficientes en p53 que sobreexpresan PTTG1-GFP de forma transitoria o estable, muestran signos evidentes de aneuploidías, como la presencia de micronúcleos, macronúcleos o puentes cromosómicos (Yu *et al.*, 2000). De hecho, el 34 % de las células transfectadas de forma transitoria (1% en células control) y el 10% de las células transfectadas establemente (5% en control), mostraban señales de aneuploidía (Yu *et al.*, 2000).



Figura XII. PTTG1 induce la formación de tumores en ratones desnudos. Los ratones desnudos atímicos fueron inyectados con células (3×10^5) NIH3T3 que habían sido previamente transfectadas con el vector que contenía PTTG1 (PTTG) o bien con el vector vacío (C). La fotografía fue tomada 3 semanas después de la infección (Pei. *et al.*, 1997).

La importancia de PTTG1 para la estabilidad cromosómica fue confirmada en las células humanas HCT116 de cáncer colorrectal (Jallepalli *et al.*, 2001), una línea celular con cariotipo diploide estable y con los *checkpoints* de daño al DNA y del huso mitótico intactos (Lengauer *et al.*, 1997; Bunz *et al.*, 1998). La inactivación de PTTG1 por recombinación homóloga en estas células (HCT116^{pttg1-/-}) producía la pérdida de cromosomas unida a anafases anormales, durante las cuáles las células experimentaban intentos fallidos de segregación cromosómica de forma repetida (Jallepalli *et al.*, 2001). La mitosis anormal debido a la carencia de la actividad de PTTG1 se asoció con defectos

bioquímicos en la activación de separasa y deficiencias en la rotura de la subunidad Scc1 de las cohesinas (*Jallepalli et al., 2001*).

Las células HCT116^{pttg1-/-} llegan a ser estables cromosómicamente y realizan una mitosis normal al cabo de varias generaciones, indicando la existencia de mecanismos compensatorios adicionales implicados en la segregación cromosómica en células humanas (*Pfleghaar et al., 2005*).

9. 2. Inducción o inhibición de apoptosis

La proteína p53 juega un papel crucial en la regulación de la proliferación celular, respondiendo a daños en el DNA y a diferentes tipos de estrés celular. Los niveles de proteína p53 en la célula son muy bajos y se localiza en el citosol. Bajo condiciones de estrés celular y/o genotóxico, su concentración aumenta rápidamente debido principalmente a que aumenta su vida media. La estabilización de p53 (*Linke et al., 1996; Levine, 1997; Giaccia y Kastan, 1998*) se debe a modificaciones post-traduccionales consistentes en fosforilaciones, acetilaciones y sumolizaciones (adición de un pequeño péptido del tipo ubiquitina) que cambian su conformación de manera reversible. Estas modificaciones regulan, además, la actividad biológica de p53 (*Kastan et al., 1991; Tishler, 1993*). La proteína activa entra en el núcleo y actúa como un factor de transcripción uniéndose a sus genes diana.

Los genes activados por p53 desencadenan la parada del ciclo y la reparación del DNA dañado, la senescencia o la apoptosis, según la gravedad del daño. Niveles bajos de p53, debido a un daño pequeño en el DNA, inducen la parada del ciclo celular, mientras que daños severos en el DNA inducen niveles altos de p53 y la muerte celular (*Chen et al., 1996*).

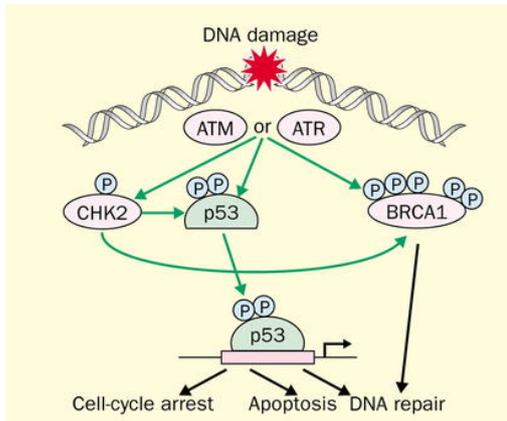


Figura XIII. Respuesta a estrés genotóxico mediada por p53. La proteína es modificada mediante fosforilación (ATM, ATR, Chk2, etc.), acetilación y sumolización y se estabiliza, actuando como un factor de transcripción.

Células JEG-3 de placenta que sobreexpresaban PTTG1 entran en apoptosis (Yu *et al.*, 2000). El mismo efecto se observa en células MCF-7 de adenocarcinoma de mama y en células MG-63 de osteosarcoma que contienen el gen p53 silvestre. La sobreexpresión de PTTG1 en estas células causa apoptosis tanto dependiente como independiente de p53 (Yu *et al.*, 2000). En células MCF-7, PTTG1 inducía p53 y su translocación al núcleo (Yu *et al.*, 2000; Hamid *et al.*, 2004). La inducción de p53 por PTTG1 parece estar mediada por la inducción del oncogén *c-myc*, el cual interacciona con el promotor de p53 (Hamid *et al.*, 2004). La sobreexpresión de PTTG1 estimula la expresión del gen *bax*, una de las dianas conocidas de p53 que codifica una proteína pro-apoptótica de la familia de BCL2 (Hamid *et al.*, 2004).

En contraste con los resultados anteriores, en nuestro laboratorio hemos demostrado que la interacción de PTTG1 con p53 bloquea la unión específica de p53 al DNA e inhibe su actividad transcripcional. La actividad del promotor del gen *bax* disminuye por la interacción p53-PTTG1, paliando el mecanismo apoptótico. De hecho, en células tumorales deficientes en PTTG1, los mecanismos dependientes de p53, como la apoptosis, o la activación de genes dianas de p53 están aumentados (Bernal *et al.*, 2002).

Según nuestros resultados, la sobreexpresión de PTTG1 bloquearía la función apoptótica de p53, provocando la acumulación de daños en el DNA y la

consiguiente aparición de mutaciones que conducirían a la formación de tumores.

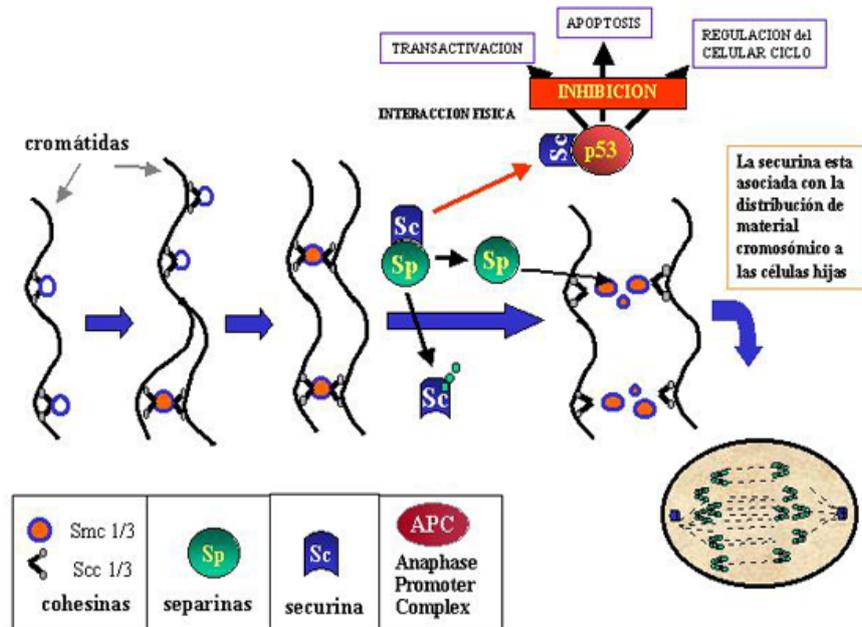


Figura XIV. Securina inhibe la función del gen supresor tumoral p53. PTTG1/Securina interacciona con p53, inhibiendo sus funciones de transactivación y la inducción de apoptosis.

La discrepancia entre estos resultados de inducción e inhibición de apoptosis podría deberse, según algunos autores, al sistema de transfección utilizado, ya que las cantidades de PTTG1 expresadas en nuestro caso (*Bernal et al., 2002*) eran relativamente más bajas comparadas con los niveles de expresión en otros estudios (*Yu et al., 2000; Hamid et al., 2004*). Así, la inducción de p53 y de apoptosis podría requerir un nivel intracelular de PTTG1 superior.

9. 3. Angiogénesis y microambiente tumorigénico

El microambiente que rodea a las células transformadas permite su crecimiento acelerado, el cual puede ser alterado por mecanismos de

retroalimentación paracrina y autocrina (*Bogdanos et al., 2003; Aguayo et al., 2003; Lazar-Molnar et al., 2000*). En este contexto, un factor importante para el crecimiento del tumor es la angiogénesis. En células de cáncer de colon, existe una elevada correlación entre la sobreexpresión de PTTG1 y la vascularización del tumor (*Heaney et al., 2000*).

La inducción de angiogénesis por PTTG1 se demostró *in vitro* al activar la proliferación, migración y formación de vasos en células umbilicales humanas crecidas en un medio de cultivo proveniente de células NIH3T3 que sobreexpresaban PTTG1 (*Ishikawa et al., 2001*). *In vivo* dicho medio concentrado inducía angiogénesis, que era inhibida, como en el caso anterior, por anticuerpos contra FGF-2 (*Ishikawa et al., 2001*). De hecho, la sobreexpresión de PTTG1 induce el mRNA y la proteína FGF-2 en células NIH3T3 (*Zhang et al., 1999; Boelaert et al., 2004; Ishikawa et al., 2001*), HEK293 (*Hamid et al., 2005*), NT-2 (*McCabe et al., 2002; Boelaert et al., 2003*), JEG-3, MCF-7 (*McCabe et al., 2002*) y células de leiomioma uterino (*Tsai et al., 2005*). En algunos casos, la sobreexpresión de PTTG1 también induce el factor VEGF-A, otro potente factor angiogénico, en células de leiomioma uterino (*Tsai et al., 2005*), células de tiroides FTC133 (*Kim et al., 2006*), células NT-2, JEG-3 y MCF-7 (*McCabe et al., 2002*); así como el gen IL-8 en células HEK293 (*Hamid et al., 2005*).

Un estudio reciente en células de tiroides transfectadas con PTTG1, empleando *arrays* de cDNAs específicos de angiogénesis, reveló la inducción de múltiples genes angiogénicos, incluyendo ID3 y TSP-1 (*Kim et al., 2006*). Los mecanismos que regulan la inducción de los factores de crecimiento mediada por PTTG1 están siendo todavía dilucidados; sin embargo, se conoce que PTTG1 junto con PBF actúan como un complejo activando la transcripción de FGF-2 (*Chien et al., 2000*).

9. 4. Capacidad metastásica y peor pronóstico de los tumores

El análisis de la expresión de PTTG1 en 72 muestras de tumor de mama reveló una correlación entre la sobreexpresión de PTTG1 y la infiltración tumoral de los nódulos linfáticos; además, la sobreexpresión de PTTG1 se correlacionó con un grado mayor de recurrencia del tumor dentro del período de observación de 5 años (*Solbach et al., 2004*). Inmunohistoquímica de PTTG1 en 90 tumores de mama y 18 tejidos normales también mostraron una expresión más elevada de PTTG1 en células derivadas de tumores metastásicos y carcinomas ductales invasivos, así como una expresión mayor del mRNA en tumores invasivos respecto a los no invasivos (*Ogbagabriel et al., 2005*). De hecho, la expresión de PTTG1 se ha propuesto como un marcador potencial de la agresividad del cáncer de mama (*Solbach et al., 2004*; *Ogbagabriel et al., 2005*).

En cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), como en carcinomas de esófago y colon, la expresión elevada de PTTG1 también se ha asociado con un tiempo de supervivencia menor y un fenotipo más agresivo (*Rehfeld et al., 2006*; *Heaney et al., 2000*; *Shibata et al., 2002*).

Por último, un estudio llevado a cabo con muestras correspondientes a metástasis provenientes de distintos tipos de adenocarcinomas, y encaminado a determinar la existencia de genes específicos asociados a metástasis, detalla la existencia de 17 genes cuya expresión o represión génica se asocia con la capacidad de la célula tumoral de generar metástasis. Uno de los genes inducidos en las muestras de metástasis estudiadas era *pttg1* (*Ramaswamy et al., 2003*).

10. MODELOS DE RATONES KNOCK-OUT PARA PTTG1

A pesar de que la pérdida de la securina en levaduras (Pds1 ó Cut2) o en *Drosophila* (Pimples) es letal (*Stratmann et al., 1996*; *Ciosk et al., 1998*), la

eliminación del gen *pttg1* de ratón por recombinación homóloga origina un fenotipo fértil y viable con defectos específicos de tejido, incluyendo hipoplasia de hipófisis, testicular y pancreática (Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003). Los ratones *pttg1*^{-/-} son fértiles aunque el tamaño de la camada es más reducido comparado con el de los ratones *pttg1*^{+/-} ó *pttg1*^{+/+} (Wang. *et al.*, 2001). Los ratones *pttg1*^{-/-} muestran hipoplasia testicular y del bazo, hiperplasia tímica y trombocitopenia (Wang *et al.*, 2001). La hipoplasia testicular es más pronunciada en ratones maduros sexualmente, mientras que la hipoplasia del bazo se observa poco después del nacimiento y se mantiene durante los ocho meses de observación (Wang. *et al.*, 2001). La hiperplasia tímica es aparente a las cuatro semanas después del nacimiento y persiste durante los ocho meses de observación, siendo más pronunciada a edades tempranas (Wang *et al.*, 2001). La distribución de timocitos CD4+CD8+, CD4+CD8- y CD4-CD8- difería en ratones *pttg1*^{-/-}, y los análisis hematológicos revelaron la presencia de trombocitopenia, a pesar de existir un número de megacariocitos normal en la médula ósea (Wang. *et al.*, 2001).

Los fibroblastos embrionarios (MEFs) de los ratones *pttg1*^{-/-} y *pttg1*^{+/+} mostraban un tiempo de duplicación similar (alrededor de 30 horas), pero sus parámetros de ciclo celular diferían marcadamente, siendo la fase G1 de los MEFs^{-/-} más corta que la de los MEFs^{+/+}, y estando la fase G2/M prolongada en los MEFs^{-/-}. Este efecto se revertía parcialmente con la introducción de *pttg1* en los MEFs^{-/-} (Wang *et al.*, 2001).

Los MEFs^{-/-} mostraban núcleos dañados, núcleos rotos, binucleados o multinucleados, y cromosomas con morfología aberrante, cromosomas cuadrirradiales, tri-radiales, así como aneuploidías y división prematura de los centrómeros. Sin embargo, estas anomalías no eran letales para las células (Wang. *et al.*, 2001).

Los ratones *pttg1*^{-/-} han revelado una importante función de PTTG1 en las células β pancreáticas (Wang *et al.*, 2003). La supresión de PTTG1 desestabilizaba la homeostasis de la glucosa y conducía a la diabetes selectiva

en los machos, apareciendo en la edad adulta tardía (*Wang et al., 2003*). El desarrollo de diabetes está asociado con daño no autoinmune de los islotes pancreáticos, insulinopenia y con una tasa revertida de células α y β (*Wang. et al., 2003*). La reducción de la masa de células β en los islotes es evidente antes de la manifestación de la diabetes y la proliferación de las células de los islotes se reduce notablemente, como muestran los ensayos de incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina. Las células β de los ratones *pttg1*^{-/-} presentan núcleos pleiomórficos, sugiriendo defectos en la división celular (*Wang. et al., 2003*).

La implicación de PTTG1 en la diabetes está apoyado además por un extenso estudio de expresión en el cerebro de los ratones para dilucidar redes genéticas. La aplicación de este estudio ha identificado y validado experimentalmente rasgos predictivos que responden a una fuerte expresión característica del locus *pttg1*, y la expresión de *pttg1* en cerebro se ha asociado a rasgos metabólicos, incluyendo obesidad y diabetes (*Lum et al., 2006*).

11. MODELOS DE RATONES QUE SOBREENPRESAN PTTG1

La expresión exógena de PTTG1 en hipófisis de ratón conlleva hiperplasia focal en dicho órgano, así como la formación de adenomas secretores de LH, GH y TSH con la respectiva hipersecreción de dichas hormonas. Altos niveles de hormona LH traían consigo niveles elevados de testosterona y una consecuente hipertrofia de la vesícula seminal. Los ratones con adenomas secretores de GH expresaban altos niveles de IGF-I (*Abbud et al., 2005*). Por otro lado, el tamaño del complejo de Golgi de las células hipofisarias tras la sobreexpresión de PTTG1 era muy superior al de ratones control, y se observaban numerosos gránulos secretores, así como un aumento de los gonadotrofos. Los niveles elevados de PTTG1 conllevan, además, una más alta prevalencia de los tumores de la hipófisis anterior, relacionando directamente a PTTG1 con el potencial tumorigénico (*Abbud et al., 2005; Donangelo et al., 2006*).

La sobreexpresión de la proteína PTTG1 en células HEK293 traía consigo un aumento de la proliferación, el crecimiento independiente de anclaje al substrato y la formación de tumores en ratones desnudos. Los tumores desarrollados en dichos ratones expresaban niveles más elevados de los factores de crecimiento bFGF, VEGF e IL-8, comparados con otros tejidos no tumorales del ratón. Además de la expresión de estas proteínas, también aumentada la secreción de ellas. Mutaciones en los motivos ricos en prolina en el C-terminal de PTTG1 eliminaban sus propiedades oncogénicas, ya que al inyectar en ratones las células transfectadas con estas formas mutadas, los ratones no formaban tumores o éstos eran muy pequeños (*Hamid et al., 2005*).

El grupo de Kakar (*Shahenda et al., 2007*) ha estudiado específicamente la función de PTTG1 en la tumorigénesis del ovario. El fragmento de cDNA de Pttg1 se clonó bajo el promotor del gen MISIR que codifica un receptor específico del epitelio de la superficie del ovario. En los ratones transgénicos seleccionados, la expresión de PTTG1 estaba incrementada no sólo en el epitelio superficial de los ovarios de las hembras, sino también en las células de la granulosa ovárica y en la hipófisis. Dichas hembras transgénicas no desarrollaban tumores ováricos visibles en los primeros 8-10 meses de edad, pero presentaban una mayor tasa de luteinización, a juzgar por el incremento de la masa del cuerpo lúteo. Estos cambios estaban asociados con un aumento en sangre de los niveles de LH y testosterona. Además, las ratonas presentaban una hipertrofia del miometrio y una hiperplasia del endometrio (*Shahenda et al., 2007*). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de PTTG1 desencadena condiciones precancerosas en ovario pero que éstas no son suficientes para inducir tumorigénesis, siendo necesaria probablemente la represión o activación de otros genes para inducir la tumorigénesis.

III. OBJETIVOS

Los objetivos planteados en esta Tesis han sido los siguientes:

1. Teniendo en cuenta la capacidad transactivadora de PTTG1, un objetivo de este trabajo ha sido analizar los cambios de expresión génica producidos por la sobreexpresión de PTTG1 en células no tumorales, con el fin de determinar genes diana implicados en el efecto tumorigénico de PTTG1.
2. Dada la escasa información acerca de la localización subcelular de PTTG1, y teniendo en cuenta su implicación en el ciclo celular, otro objetivo de este trabajo ha sido determinar la localización subcelular de PTTG1 en distintas líneas celulares normales y tumorales y poder asociarla a putativas funciones de esta proteína.
3. Ya que las células humanas son viables al carecer de PTTG1, un tercer objetivo de este trabajo ha sido determinar la presencia de moléculas homólogas o análogas a PTTG1 que pudieran compensar funcionalmente la ausencia de ésta.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Líneas celulares

| Línea Celular | Especie | Origen/Características | Medio de Cultivo |
|---------------|---------|---|-----------------------|
| NIH3T3 | Ratón | Fibroblastos embrionarios No tumorales | DMEM 10% NCS |
| NIH3T3-L1 | Ratón | Preadipocitos. No tumorales | DMEM 10% NCS |
| HeLa | Humana | Epitelial. Adenocarcinoma de cervix | DMEM 10% FBS |
| COS-7 | Mono | Fibroblastos de riñón transformados con el antígeno T del SV40 | DMEM 10% FBS |
| HCT116 | Humana | Epitelial. Adenocarcinoma colorrectal | McCoy's 5a 10% FBS |
| HCT116 sec-/- | Humana | Epitelial. Adenocarcinoma colorrectal. KO somático de <i>pttg1</i> | McCoy's 5a 10% FBS |
| HL-60 | Humana | Leucemia promielocítica | RPMI 1640 10% FBS |
| RPE-1 | Humana | Epitelio de retina. Inmortalizada | DMEM/F12 10% FBS |
| A293T | Humana | Epitelio de riñón | DMEM 10% FBS |
| U-2 OS | Humana | Epitelial. Osteosarcoma | McCoy's 5a 10% FBS |
| MCF7 | Humana | Epitelial. Adenocarcinoma de mama | DMEM 10% FBS |
| H1299 | Humana | Epitelial. Adenocarcinoma de células no pequeñas de pulmón | RPMI 1640 10% FBS |

1.2. Drogas

| Reactivo | Descripción | Concentración final | Referencia/ Procedencia |
|---------------------|---|---------------------|--|
| BrdU | Análogo de la timidina utilizado para marcar DNA | 10 μ M | Roche Ref. 11 810 740 001 |
| Cicloheximida (CHX) | Inhibidor de la síntesis proteica | 40 μ g/ml | Fluka 01810 |
| Z-VAD-fmk | Inhibidor general de caspasas | 100 μ M | Dr A. Lopez-Rivas CABIMER, Sevilla |
| Brefeldina A (BFA) | Metabolito de origen fúngico que inhibe la secreción de proteínas. Provoca la desorganización del aparato de Golgi. | 5 mg/ml | Sigma Ref. B6542 |
| Nocodazol (Nz) | Compuesto que provoca la despolimerización de los microtúbulos de la célula | 10 μ M | Sigma Ref. M1404 |
| Doxorrubicina | Inhibidor de la Topoisomerasa II. Induce roturas de doble cadena en el DNA | 0.2 μ g/ml | Sigma Ref. D1515 |

1.3. Anticuerpos primarios

| Anticuerpo | Origen | Dilución | Referencia |
|----------------|--------------------|--------------------------------|--|
| PTTG1/SECURINA | Conejo. Policlonal | WB (1:2000) IF (1:1000) | Obtención y purificación durante la Tesis Doctoral |
| PTTG2 | Conejo. Policlonal | WB (1:100) | Obtención y |

| | | | |
|--------------------|--------------------|-----------------------------|--|
| | | IF (Puro) | purificación durante la Tesis Doctoral |
| PTTG3 | Conejo. Policlonal | WB (1:300) IF (Puro) | Obtención y purificación durante la Tesis Doctoral |
| CICLINA B1 | Ratón. Monoclonal | WB (1:1000) IF (1:10000) | BD Transduction |
| DLK1 | Cabra. Policlonal | WB (1:400) IHQ (1:300) | Santa Cruz |
| PARP-1 | Conejo. Policlonal | WB (1:5000) | Roche |
| GM130 | Ratón. Monoclonal | IF (1:250) | Sigma |
| RM130 | Conejo. Policlonal | WB (1: 5000) | Sigma |
| α -TUBULINA | Ratón. Monoclonal | WB e IF(1:40000) | Sigma |
| β -ACTINA | Ratón. Monoclonal | WB (1:40000) | Sigma |
| PCNA | Ratón. Monoclonal | WB (1:10000) | Santa Cruz |
| RIBOFORINA I | Ratón. Monoclonal | WB (1:1000) | Santa Cruz |
| p53 (DO-1) | Ratón. Monoclonal | WB (1:2000) IF (1:8000) | Santa Cruz |
| Ku-70 | Ratón. Monoclonal | WB e IF(1:10000) | Neomarkers |
| COP I | Ratón. Monoclonal | WB (1:1000) | Sigma |

1.4. Anticuerpos secundarios

| Anticuerpo | Origen | Dilución | Fluorocromo/ Enzima conjugada | Referencia |
|--------------------------------------|--|---------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| IgG anti- conejo- fluoresceína | Cabra, específico del fragmento Fc | IF(1:1000) | Fluoresceína | Jackson ImmunoResearch |
| IgG anti-ratón fluoresceína | Cabra, específico del fragmento Fc | IF (1:1000) | Fluoresceína | Jackson ImmunoResearch |
| IgG anti- conejo-alexa red | Policlonal | IF (1:1000) | Alexa Red | Molecular Probes |
| IgG anti-ratón- alexa red | Policlonal | IF (1:1000) | Alexa Red | Molecular Probes |
| IgG anti- conejo- peroxidasa | Policlonal | WB 1:8000 | Peroxidasa | Amersham Bioscences |
| IgG anti-ratón- peroxidasa | Policlonal | WB 1:10000 | Peroxidasa | Amersham Bioscences |
| IgG anti-cabra- peroxidasa | Policlonal | WB 1:2000 | Peroxidasa | Dako |

1.5. Plásmidos

| Nombre | Referencia | Resistencia Antibiótico | Aplicación |
|------------------|---------------------------------------|-------------------------|---|
| pSK | Stratagene | Ampicilina | Clonación en general |
| pCDNA3 | Invitrogen | Ampicilina | Expresión en eucariotas |
| pEGFP – N1/C1 | Clontech | Kanamicina | Inmunolocalización |
| pCDNA3.1-myc/His | Invitrogen | Ampicilina | Inmulocalización Inmunoprecipitación |
| pGEMT-easy | Promega | Ampicilina | Clonación de productos de PCR |
| pRESET B | Invitrogen | Ampicilina | Proteínas de fusión a Histidina |
| pGEX 4T-2 | GE | Ampicilina | Proteínas de fusión a GST |
| pCMV-DLK | Promega | Ampicilina | Ensayos de transactivación |
| pCMV-Renilla | Promega | Ampicilina | Ensayos de transactivación |
| pCR 2.1 | Invitrogen | Ampicilina | Clonación de productos PCR |
| pSUPERbasic | OligoEngine | Ampicilina | Expresión de siRNAs |
| pHRSIN-CSGW | M.K. Collins (Windeyer Inst., London) | Ampicilina | Vector lentiviral |
| pOPRSVI/MCS | Stratagene | Ampicilina | Generación del sistema inducible de PTTG1 |
| pCMVLacI | Stratagene | Ampicilina | Expresión de la proteína represora Lac |

1.6. Oligonucleótidos de iRNA

| Especificidad | Nombre (sentido/antisentido) | Secuencia |
|-----------------|--|---|
| PTTG1 (oligo 1) | ipttg1_S ipttg1_A | GTCTGTAAAGACCAAGGGAdTdT UCCCUUGGUCUUUACAGACdTdT |
| PTTG1 (oligo 2) | ipttg1 ₍₂₎ _S ipttg1 ₍₂₎ _A | CTTACCTAAAGCTACTAGA dTdT UCUAGUAGCUUUAGGUAAGdTdT |

| | | |
|----------------------|------------------------------|--|
| PTTG2 | ipttg2_S ipttg2_A | TGACGCCTATCCAGAAATA dTdT UAUUUCUGGAUAGGCGUCAdTdT |
| PTTG3 | ipttg3_S ipttg3_A | TCAATCCTCTAGGCTTCGA dTdT UCGAAGCCUAGAGGAUUGAdTdT |
| PTTG2 Y PTTG3 | ipttg2y3_S ipttg2y3_A | CTTACCTAAAGCTACCAGA dTdT UCUGGUAGCUUUAGGUAAGdTdT |
| PTTG1, PTTG2 Y PTTG3 | ipttg1,2y3_S ipttg1,2y3_A | CAGCCAAGCTTTTCTGCCA dTdT UGGCAGAAAAGCUUGGCUGdTdT |
| DLK1 | idlk1_S idlk1_A | GAAAGGACUGCCAGCACAAAdTdT UUGUGCUGGCAGUCCUUUCdTdT |
| Inespecífico | icontrol_S icontrol_A | UUCUCCGAACGUGUCACGU dTdT ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT |

2. MÉTODOS

2.1. Manipulación del DNA

2.1.1. Purificación de plásmidos de bacterias

Se siguió el protocolo de lisis alcalina descrito por Maniatis en 1982. Cuando se requirió DNA de gran pureza se utilizaron los kits de purificación de plásmidos de las casas comerciales Nucleobound y Eppendorf y se siguieron los protocolos indicados.

2.1.2. Cuantificación del DNA

La concentración de DNA se estimó a partir de la absorbancia a 260 nm, teniendo en cuenta que 1 OD₂₆₀ equivale a 50 µg/ml de DNA de cadena doble. La concentración se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa, en donde también se comprobó la integridad del DNA aislado.

2.1.3. Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las endonucleasas de restricción utilizadas fueron principalmente de las casas comerciales Roche, Cell Signalling y GE.

2.1.4. Electroforesis de DNA

Los fragmentos de DNA se resolvieron en geles de agarosa utilizando el tampón TAE 1X suplementado con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio (EtBr); este mismo tampón TAE 1X fue el que se utilizó como electrolito. Las muestras se mezclaron con tampón de carga de DNA hasta una concentración final 1X previamente a la electroforesis. El porcentaje de agarosa de los geles osciló entre 0.8 y 2% dependiendo del tamaño de los fragmentos a resolver.

TAMPÓN TAE 1X: 40 mM Tris–acetato pH 8, 2 mM EDTA, 5 mM AcNa.

TAMPÓN DE CARGA DE DNA 10X: 25% Ficoll 400, 10 mM EDTA, 0.255% azul de bromofenol.

SOLUCIÓN DE EtBr: 10 mg/ml en H₂O.

2.1.5. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Se utilizaron *kits* de purificación de las casas comerciales Eppendorf y Sigma y se siguieron las indicaciones del fabricante.

2.1.6. Ligación de moléculas de DNA

Después de la digestión de los plásmidos empleados como vectores de clonación con las enzimas de restricción correspondientes, sus extremos 5' fueron desfosforilados con fosfatasa alcalina (Roche). Los fragmentos de DNA (insertos) se incubaron con los vectores de clonación en presencia de T4 ligasa (Invitrogen) en un volumen final de 10 a 20 µl y en una proporción molar de inserto:vector de 3:1. La ligación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas o bien a 16 °C durante toda la noche.

2.2. Transformación de bacterias

2.2.1. Transformación química

Las bacterias competentes se obtuvieron según el método descrito por Hanahan *et al.*, 1983, así como por Inoue *et al.*, 1990. El protocolo empleado para la transformación de *E. coli* (XL BLUE ó BL21) fue el descrito en Sambrook *et al.*, 1989. Generalmente se utilizaron 1/5 a 2/5 del volumen de la reacción de ligación.

2.2.2. Electroporación

La estirpe de *E. Coli* electrocompetente empleada para la obtención de proteínas de fusión fue BL21 (DE3 ó CodonPlus-RP, según los casos). Las bacterias se electroporaron en cubetas de 0.2 cm, utilizando un electroporador BTX bajo las siguientes condiciones: 2.5 KV, 200 Ω y 25 μ F.

Los transformantes se seleccionaron en medio LB (*Luria-Bertani*) suplementado con el antibiótico de resistencia del plásmido correspondiente.

Medio LB: 10 g/l bactotripton, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl. Para medio sólido se añaden 15 g/l de agar.

2.3. Mutagénesis dirigida

Se empleó el kit de CLONTECH de mutagénesis puntual “*Transformer™ Site – Directed Mutagenesis*” para la obtención de la proteína PTTG1 mutada en las cajas de destrucción D y KEN. Se partió de una construcción previa correspondiente al gen *pttg1* mutado en la caja D. Los cebadores utilizados para mutar la caja KEN fueron:

Cebador I: TAGAACTAATCGATCCCCGGGCTGCA (Elimina la diana BamHI en el vector pSK e introduce una diana ClaI).

Cebador II: CTATGTTGATAAGGCAGCTGGAGAACCAGGC (Introduce una diana PvuII que posibilita la selección de clones positivos mediante digestión del plásmido pSK-Pttg1DM con dicha enzima de restricción).

Las mutaciones puntuales en ambas cajas fueron las siguientes:

KEN-BOX: AAGGAAAAT (K E N)

KEN-BOX MUTADA: AAGGCAGCT (K A A)

D-BOX: AGAAAGGCTTTGGGAAGTGTCAA (R K A L G T V)

D-BOX MUTADA: GCTAAGGCTCGGGTACCGTCAA (A K A A G T V)

2.4. Cultivos celulares

2.4.1. Descongelación, subcultivo y congelación de células

Las células almacenadas en nitrógeno líquido se descongelaron rápidamente a 37 °C y se centrifugaron a 1000 rpm durante 8 minutos en tubos de 15 ml que contenían 10 ml de medio de cultivo correspondiente al tipo celular. Las células se resuspendieron en medio fresco y se pasaron a placas o frascos de cultivo. Se cultivaron en una atmósfera húmeda a 37 °C con 5% de CO₂.

Para el subcultivo, las células se tripsinizaron añadiendo 1/10 del volumen del medio de cultivo empleado de una solución estéril de tripsina al 0.25% en PBS 1X durante 3–10 minutos (dependiendo de la línea celular) a 37 °C. Una vez despegadas, las células se resuspendieron con 10 volúmenes de medio de cultivo fresco para neutralizar la tripsina utilizada y repartir el volumen de

dilución adecuado en nuevas placas o frascos de cultivo para su mantenimiento.

Para la congelación posterior, las células se resuspendieron en un volumen adecuado de medio de congelación (a 4 °C) y se distribuyeron en viales de congelación de 2 ml. Estos viales se mantuvieron durante 2 horas a -20 °C, se pasaron a -80 °C durante 16 horas y finalmente se guardaron en nitrógeno líquido.

MEDIO DE CONGELACIÓN: 5% DMSO, 95% suero correspondiente al tipo celular (FBS ó NCS)

2.4.2. Sincronización de cultivos

Al ser PTTG1 una proteína que cicla, para ciertos experimentos como la inmunolocalización se obtuvieron cultivos sincronizados o enriquecidos en las distintas fases del ciclo celular:

Fase G1: Se siguió el método de privación de suero descrito por *Brinkmann et al.*, 1995. A los cultivos celulares mantenidos en condiciones exponenciales de crecimiento se les redujo la concentración de suero hasta el 0.15%. Las células se incubaron a 37 °C durante 72 horas, período al cabo del cual se recogieron para su análisis.

Otro método seguido para sincronizar en esta fase del ciclo fue “por confluencia”. Las células se cultivaron hasta que alcanzaron la inhibición por contacto y se mantuvieron en estas condiciones durante 48 horas; a continuación se despegaron, diluyeron y sembraron, y se cultivaron durante 6 horas.

Fase S: Se partió de un cultivo proliferante cuyo medio fue suplementado con 2.5 mM de timidina (Sigma). Tras 16 horas de incubación con este compuesto (bloquea el ciclo celular en la transición G1/S), las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron en medio fresco completo durante 8 horas (período sin

timidina), tras lo cual se repitió la operación anterior añadiendo medio suplementado con timidina e incubando las células durante 16 horas. Se volvió a retirar este medio, se lavaron las células y se incubaron con medio fresco durante 4 horas más. Tras este tiempo la mayoría de las células se encontraban en fase S.

Para sincronizar las células en la transición G1/S (experimentos de interferencia), se llevó a cabo el doble bloqueo con timidina, evitando el paso final de incubación en medio fresco. Las células se transfectaron manteniendo la timidina en el medio hasta 24 horas después de la interferencia.

Fase G2: El cultivo de células en fase G2 se obtuvo tras un período de incubación de 8 horas en medio fresco tras la liberación del doble bloqueo con timidina descrito anteriormente.

Fase M: El cultivo proliferante se incubó en medio fresco suplementado con 5 μ M de nocodazol (Sigma) durante 16-24 horas.

2.5. Transfección transitoria de células de mamífero

2.5.1. Electroporación

Los cultivos de las distintas líneas celulares se diluyeron de forma que al realizar la transfección estuviesen subconfluentes (70 – 80%). Se utilizaron placas de 10 ó 15 cm de diámetro dependiendo del tamaño celular para conseguir 4×10^6 células de cultivo no saturado. Una vez despegadas las células se contaron utilizando un hemocitómetro y se recogieron por centrifugación a 1000 rpm durante 8 minutos. Se resuspendieron en un volumen adecuado de medio de electroporación para obtener 4×10^6 células en 200 μ l. Por otra parte, la mezcla de DNA se preparó en un tubo eppendorf estéril conteniendo de 5 a 20 μ g de DNA plasmídico en un volumen final de 50

μ l y NaCl a una concentración de 210 mM. En todos los casos la cantidad final de DNA se completó hasta 40 μ g con DNA de espermatozoos de salmón. Las células se mezclaron con la solución de DNA correspondiente y se pasaron a la cubeta de electroporación (4 mm). Las condiciones de electroporación usadas fueron de 240 V para células HeLa y 200 V para COS-7; en ambos casos la resistencia se fijó en infinito y la capacitancia en 950 μ F. Tras el pulso de electroporación, el contenido de la cubeta se recogió en 10 ml de medio de electroporación y se centrifugó a 1000 rpm durante 8 minutos. Las células se resuspendieron en medio fresco y se hicieron las diluciones apropiadas. Las células se recogieron para extracción de proteínas o RNA / inmunofluorescencia transcurridas 8, 24 ó 48 horas según los casos.

MEDIO DE ELECTROPORACIÓN: Medio de cultivo fresco suplementado con 15 mM de HEPES pH 7.4.

STOCK HEPES: 1.5 M HEPES pH 7.4 ajustado con NaOH y filtrado.

2.5.2. FuGENE 6

El compuesto FuGENE 6 (Roche) es un reactivo lipídico no liposomal de baja toxicidad, lo que permite utilizarlo sin necesidad de retirar los complejos DNA:FuGENE tras la transfección, aumentando así la eficacia.

Las células se sembraron en pocillos de 35 mm ϕ de manera que en el momento de la transfección estuviesen a un 60–70% de confluencia. Las mezclas de transfección se prepararon a una relación 3:1 (3 μ l de FuGENE 6 por cada 1 μ g de DNA) para todos los cultivos utilizados. Por cada reacción se prepararon 100 μ l de mezcla de medio de cultivo sin suero con el reactivo, evitando el contacto de este último con cualquier superficie. La mezcla se homogenizó por agitación en vórtex y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Tras esto se le añadió el DNA (diluido en medio sin antibiótico), se agitó de nuevo empleando vórtex y se repitió la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos. El medio de cultivo de las células se sustituyó por medio fresco completo antes de la transfección (800 μ l por pocillo). La mezcla de reacción se distribuyó gota a

gota por la superficie del pocillo. Las células se incubaron a 37 °C hasta su recogida.

2.5.3. Lipofectamina 2000

Las células se sembraron en pocillos de 35 mm ϕ en medio sin antibiótico, de manera que en el momento de la transfección estuviesen a un 60-70% de confluencia. El DNA y la lipofectamina se mezclaron por separado con medio Opti-MEN. Tras 5 minutos a temperatura ambiente, se mezclaron ambas soluciones, añadiendo la solución de lipofectamina sobre la de DNA y no al contrario. La mezcla resultante se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y se distribuyó gota a gota sobre el cultivo celular al que previamente se le había sustituido el medio sin antibiótico por 800 μ l de Opti-MEN. Transcurridas 6 horas se retiró el medio Opti-MEN y se añadió medio fresco suplementado con suero y antibiótico. Las cantidades de DNA y lipofectamina se ajustaron según el número de células y se optimizó para cada tipo celular.

2.6. Obtención de células estables NIH3T3-pttg1

La línea celular de ratón NIH3T3 se transfectó con la construcción pOPI3-CAT (NIH3T3-CAT), como control, o la construcción pOPI-pttg1 (NIH3T3-pttg1). Las células fueron primeramente transfectadas con el vector pCMVLacl (resistencia a higromicina) para que expresaran constitutivamente el represor Lacl cuyo operador está incluido en el vector pOPI3. Los genes *cat* ó *pttg1* se inducen en estas células tras la adición al medio de IPTG hasta una concentración final de 4 mM (sistema de expresión inducible de mamíferos *LacSwitchII*). La construcción pOPI3-CAT de las células control portaba el gen *cat* que codifica la enzima cloranfenicol acetil transferasa.

Por el mismo sistema se obtuvieron células NIH3T3 transfectadas establemente con el gen *pttg1* mutado en el codón correspondiente al residuo

Ser165, diana de fosforilación de la quinasa CDK1. El residuo Ser 165 fue sustituido por Alanina, obteniendo así las células NIH3T3-SA, o bien por Glutámico, obteniendo las células NIH3T3-SE. También se obtuvieron clones estables de células NIH3T3 con el gen *pttg1* mutado en las cajas de destrucción D y KEN (NIH3T3-pttg1DK).

2.7. Inhibición de la expresión de *pttg1*, *pttg2*, *pttg3* y *dlk1* mediante RNA de interferencia (iRNA)

El silenciamiento génico mediado por RNA de interferencia permite suprimir la expresión de genes específicos de interés. Se basa en introducir en las células oligonucleótidos de RNA de doble cadena (dúplex) de 20-25 nucleótidos de tamaño y que poseen una secuencia idéntica al gen que se desea silenciar.

Para transfectar células con iRNA de doble cadena, se empleó el reactivo Oligofectamina (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. Las células se sembraron 24-48 horas antes de la transfección (dependiendo de la mayor o menor capacidad de extenderse en las placas de cultivo) en pocillos de 35 mm ϕ y en medio sin antibióticos.

Los oligos de interferencia, diseñados previamente a través del programa Dharmacon y suministrados por la casa Proligo-SIGMA, se mezclaron con medio Opti-MEN (Invitrogen), mientras que en otros tubos se hicieron las mezclas de este medio con la oligofectamina, manteniendo una relación oligo/oligofectamina (v/v) de 1.5 en todos los casos. Tras 5-10 minutos se mezclaron ambas soluciones y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Durante este tiempo, se sustituyó el medio de cultivo por 800 μ l de Opti-MEN. El volumen total que posteriormente se añadió a cada pocillo fue de 200 μ l, resultando, por tanto, un volumen final de 1 ml por pocillo. Transcurridas de 6 a 24 horas, se sustituyó el Opti-MEN por medio fresco completo. Las células se recogieron para su análisis tras 48-72 horas, según los casos.

2.8. Análisis del RNA

2.8.1. Aislamiento de RNA total

Se utilizó el reactivo TRIZOL (GibcoBRL) para aislar el RNA total de las células cultivadas siguiendo las especificaciones del fabricante.

2.8.2. Cuantificación de RNA

La concentración de RNA se estimó por espectrofotometría, considerando que 1 OD₂₆₀ equivalía a 40 µg/ml de RNA. Se hicieron geles de agarosa al 1.8% para confirmar la concentración y analizar la integridad del RNA aislado.

2.8.3. Electroforesis de RNA y transferencia a membrana de nailon (*northern blot*)

Las muestras de RNA (10 µg) se desnaturalizaron a 65 °C durante 15 minutos en tampón Northern 1X con 50% de formamida y 6.5% de formaldehído. Se resolvieron en geles de agarosa-formaldehído al 1,2% (Tsang *et al.* , 1993). Concluida la electroforesis, los geles se equilibraron en tampón de transferencia SSC 20X, al igual que las membranas de nailon. La transferencia se llevó a cabo por capilaridad durante al menos 12 horas. La membrana se irradió con luz ultravioleta en un *Crosslinker UVP CL-1000* para fijar el RNA (1200 J/m²). Finalmente, se incubó en azul de metileno para teñir el RNA de manera reversible y visualizar la cantidad cargada por pocillo. Las bandas correspondientes a los RNA ribosómicos se utilizaron como marcadores de tamaño. La membrana se destiñó con una solución de SSC 0.2 X, SDS 1%.

GELES AGAROSA-FORMALDEHÍDO: 1.2% agarosa, 0.22 M formaldehído.

NORTHERN 10X: 0.2 M MOPS, 80 mM AcNa, 10 mM EDTA. Ajustado a pH 7.

TAMPÓN DE CARGA PARA RNA 10X: 50% glicerol, 1mM EDTA pH 8, 0.25% azul de bromofenol.

SSC 20X: 3 M NaCl, 0.3 M citrato sódico. Ajustado a pH 7.

AZUL DE METILENO PARA RNA: 0.5 M acetato sódico (pH 5.2), 0.04% azul de metileno

2.8.4. Marcaje radiactivo de la sonda de DNA

Las muestras de DNA (200 ng) se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos y se incubaron posteriormente en hielo durante 3 minutos. Se utilizó el kit de GE “*Oligolabelling Kit*” para el marcaje radiactivo. Se añadió 2 µl de tampón de marcaje 10X, 3 µl de mezcla de desoxiribonucleótidos (dATP, dTTP, dGTP), 1 µl de enzima Klenow y 3 µl de 5'-[α³²P]-dCTP (10µCi/µl) hasta completar el volumen final de 20 µl. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C. Los nucleótidos radiactivos no incorporados en la reacción de marcaje se separaron de la sonda marcada por cromatografía en columnas de Sephadex G-100.

SEPHADEX G-100: 10 g de Sephadex G-100 en 200 ml de H₂O milliQ. Se agita y se deja que decante repetidas veces, lavando con H₂O milliQ. Por último se equilibra en tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8).

2.8.5. Hibridación radiactiva

Las membranas de nailon provenientes del *northern blot* se prehibridaron en solución de hibridación durante al menos 1 hora a 42 °C. Transcurrido este tiempo, se añadió la sonda radiactiva junto con DNA de esperma de salmón para bloquear sitios inespecíficos. Ambos se desnaturalizaron previamente durante 5 minutos a 95 °C. La incubación se llevó a cabo durante 16-18 horas a 42 °C y con agitación suave. Para eliminar la radiactividad unida inespecíficamente, los filtros se lavaron con solución de lavado I durante 30 minutos a 42 °C, posteriormente durante 15-30 minutos a 65 °C y por último se sustituyó la solución de lavado por otra más restrictiva (solución de lavado II), dejándose los filtros en la misma durante 10-15 minutos a 65 °C. Se usaron películas de autorradiografía para visualizar las bandas.

SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN (50% FORMAMIDA): 50% Formamida, SSPE 5 X, Denhardt 5 X, SDS 1%.

50X DENHARDT: 5g Ficoll 400, 5g polivinilpirrolidona, 5g BSA. Llevar hasta 500 ml con H₂O.

SOLUCIÓN DE LAVADO I: SSC 2 X, SDS 0.1%.

SOLUCIÓN DE LAVADO II: SSC 0.2 X, SDS 0.1%

2.9. *Differential display*

Las células NIH3T3-pttg1 se trataron con IPTG durante 6, 12 ó 24h. Las muestras correspondientes a cada tiempo de tratamiento se recogieron y se obtuvo el RNA total correspondiente (Trizol). Se incluyó también una muestra control a tiempo 0 h. Se llevó a cabo la transcripción reversa de las poblaciones de mRNA a partir de 200 ng de RNA total por muestra, empleando cebadores oligo-dT (oligo-dT-A/ C/ G) que dividieron la población de mensajeros en tres subpoblaciones, facilitando así el análisis. Las moléculas de cDNA sintetizadas se amplificaron por PCR utilizando una combinación de 32 cebadores aleatorios distintos por cada oligo-dT empleado (*GenHunter RNA Image kit*). Con este número de combinaciones se aseguraba la representación de más del 75% de los mRNA presentes en las células. En esta etapa de amplificación, los cDNAs se marcaron radiactivamente al incluir en la reacción el radioisótopo α -[³³P]-dATP. Los cDNAs resultantes se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (urea) a 1600 V durante aproximadamente 4 horas en Tampón TBE 1X, hasta que el colorante *xylene cianol* alcanzó el extremo del gel. Las bandas se visualizaron por autorradiografía. Los fragmentos de gel que correspondían a bandas diferenciales se recortaron, eluyéndose el DNA (según el protocolo especificado en el *kit GenHunter*) y subclonándose en el vector pGEMT. Los fragmentos clonados se secuenciaron y a partir de los cebadores M13 (*forward* y *reverse*) se obtuvo el fragmento de cDNA de doble cadena, que se marcó radiactivamente (5'-[α ³²P]-dCTP) para confirmar la expresión diferencial mediante *northern blot*.

IPTG: 1 M en H₂O. La concentración final en el medio de cultivo celular fue 4 mM.

PROGRAMA DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA: 5' a 65 °C, 60' a 37 °C (al cabo de los 10 primeros minutos se añadió la enzima transcriptasa reversa MMLV -100U-), 5' a 75 °C, 4 °C. El volumen de cada reacción fue de 20 μ l. La concentración de oligo-dT final fue de 200 nM.

PROGRAMA DE PCR: [30'' a 94 °C, 2' a 40 °C, 30'' a 72 °C] x 40 ciclos, 5' a 72 °C, 4 °C.

GEL DESNATURALIZANTE DE POLIACRILAMIDA: 6% (A:B 19:1). El gel se recorrió a 1600 V durante 45'. De cada reacción de PCR (20 μ l) se cargaron 3.5 μ l mezclados con 2 μ l de Tampón de carga (95% formamida, 10 mM EDTA pH 8, 0.09% xilen cianol, 0.09 azul bromofenol) y calentados durante 5' a 80-90 °C para su desnaturalización.

TBE 5X: 450 mM Tris-HCl pH 7.6, 450 mM ácido bórico, 10 mM EDTA.

2.10. Array de cDNA

A partir de células NIH3T3-pttg1 inducidas, las poblaciones de mRNA pertenecientes a los puntos 0 y 24h con IPTG se retrotranscribieron, incluyendo en esta reacción α -[³²P]-dATP y una mezcla de oligo-dTs aleatorios. Las mezclas de sondas resultantes se hibridaron a membranas de nailon comerciales (*Atlas Mouse 1.6*) que contenían 1.176 genes de ratón. Tras lavados restrictivos se analizaron mediante autorradiografía los patrones de hibridación. Los clones que mostraron expresión diferencial se solicitaron al centro RZPD de Berlín para su confirmación por *northern blot*.

2.11. Análisis de proteínas

2.11.1. Extracción de proteínas de cultivos celulares

a. Extractos totales NP40

Las células de cultivos subconfluentes se despegaron y recogieron en tubos eppendorfs previo lavado con PBS 1X. Dependiendo del volumen de células, se añadieron de 2 a 3 volúmenes de tampón de extracción NP40 (suplementado con PMSF en el momento de usar) en frío, resuspendiendo con la pipeta hasta su homogeneización. Las muestras se incubaron en hielo durante 25 minutos y, a continuación, a 37 °C durante 3 minutos. Se

centrifugaron a 20000 x g durante 10-15 minutos a 4 °C y los sobrenadantes se mantuvieron a 4°C para su utilización inmediata o bien se guardaron a -80°C.

b. Extractos totales RIPA

Se procedió como en el caso anterior pero utilizando el tampón RIPA.

TAMPÓN DE EXTRACCIÓN NP40: 1% NP40, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% Glicerol.

Suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Chimostatina 10 µg/ml, Pepstatina 1µg/ml, Leupeptina 1µg/ml, Aprotinina 1 µg/ml).

PMSF 100X: 100 mM PMSF (fenil-metil-sulfonil fluoruro) en isopropanol.

TAMPÓN DE EXTRACCIÓN RIPA: 1% deoxicolato sódico, 0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 10 mM Tris.HCl pH 8.0, 140 mM NaCl. Suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Chimostatina 10 µg/ml, Pepstatina 1µg/ml, Leupeptina 1µg/ml, Aprotinina 1 µg/ml).

2.11.2. Producción y purificación de proteínas de fusión en bacterias

a. PTTG1-GST Y PTTG2-GST

Se utilizó el vector pGEX 4T-2 (Pharmacia) para la obtención de proteínas de fusión a GST (Glutation-S-transferasa). La expresión de estas proteínas está bajo el control del promotor Lac, que se induce con isopropil β-D-tiogalactosido (IPTG), un análogo de la lactosa. Dichas proteínas se acumulan intracelularmente y no se excretan al medio. Durante la noche se incubó a 37°C y en agitación un preinóculo de la estirpe E. Coli BL21 CodonPlus-RP* transformada previamente con el plásmido correspondiente en 30 ml de medio 2xYTG con ampicilina (100 mg/ml). A la mañana siguiente se diluyó el cultivo bacteriano y se dejó crecer de nuevo a 37 °C hasta que la densidad óptica fue de 0,6 aproximadamente. Se indujo la expresión de la proteína de fusión PTTG1/2-GST empleando 0,7 mM de IPTG durante 3 horas. Una vez inducidas las bacterias, el cultivo se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos. Las bacterias se rompieron en un mortero a 4°C con alúmina, recogiénolas

posteriormente en tampón de sonicación. Se purificaron del sobrenadante por cromatografía de afinidad en una matriz con glutation (*Glutathione-Sepharose 4B-Pharmacia*) y se eluyeron de la matriz con glutation reducido, siguiendo las instrucciones del fabricante.

MEDIO 2xTYG: 16 g/l bactotripton, 10 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl. Añadir una solución de glucosa al 20%.

TAMPÓN DE SONICACIÓN NO DESNATURALIZANTE: 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, cóctel de inhibidores de proteasas de Roche.

TAMPÓN DE ELUCIÓN: 10mM Glutation reducido en 50mM de Tris-HCl pH 8.

E. coli BL21CodonPlus-RP: Se utilizó esta estirpe bacteriana para la obtención de proteínas PTTG1 y 2 recombinantes, ya que contiene copias extra del RNA transferente del aminoácido prolina, residuo muy abundante en la proteína PTTG. Se reducen así las paradas prematuras en la traducción por falta de RNA transferente.

b. PTTG1-His, PTTG2-His y PTTG3-His

Para la obtención de las proteínas de fusión PTTG1-His, PTTG2-His y PTTG3-His se utilizó el vector pRESET B (Invitrogen). El gen de interés está regulado por un promotor inducible por IPTG. Las proteínas recombinantes obtenidas presentaban en su extremo amino un péptido formado por 6 residuos de histidina.

Una vez transformadas e inducidas las bacterias con IPTG (0.7 mM), se rompieron mediante sonicación (3 x 30 segundos con pausa de 1 minuto en hielo). Se emplearon inhibidores de proteasas que no contenían EDTA y hubo que añadir al medio 1% de sarcosil para la obtención de PTTG2. Las proteínas de fusión se purificaron por cromatografía de afinidad empleando como matriz una resina de Ni²⁺ (Talon-CLONTECH) ya que los dominios de 6-His tienen afinidad por los iones Ni²⁺. La resina Talon se equilibró en el tampón de lisis y a continuación se mezcló con el lisado bacteriano (1 mg de resina por cada 10 ml de lisado). La mezcla se incubó con agitación suave durante 2 horas a 4°C, a continuación se lavó varias veces con el mismo tampón de equilibrado/lavado. Las proteínas se eluyeron con EDTA (que compite con los residuos de 6-His) en el caso de PTTG1-His y con Trietilamina (pH 11) en el de PTTG2-His. Las

proteínas eluidas se dializaron durante la noche frente a PBS o tampón carbonato.

TAMPÓN DE EQUILIBRADO/LAVADO: 50 mM Fosfato sódico, 300 mM NaCl, ajustado a pH 7.5.

TAMPÓN DE LISIS: 50 mM Fosfato sódico, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF, cóctel de inhibidores de proteasas sin EDTA (Roche) y, en el caso de PTTG2-His, suplementado con 1% sarcosil

TAMPÓN DE ELUCIÓN: 50 mM Fosfato sódico, 300 mM NaCl, 100 mM EDTA pH 8.

TAMPÓN CARBONATO: 0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.5.

2.11.3. Cuantificación de proteínas por el método Bradford

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Ausubel (Ausubel *et al.*, 1989). La concentración de proteína se calculó a partir de la recta patrón realizada con una solución de seroalbúmina bovina (BSA).

2.11.4. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS

La electroforesis monodimensional en gel de poliacrilamida-SDS se realizó según el procedimiento descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras de proteínas se desnaturalizaron en un volumen de tampón de carga Laemmli 2X, calentando durante 5 minutos a 95 °C. Se emplearon geles de poliacrilamida al 8, 10, 12 y 15%, según el tamaño de las proteínas a resolver. La migración se llevó a cabo con voltaje constante (100-200V). Se utilizó como electrolito el tampón de electroforesis 1X. Como patrón de peso molecular se empleó el marcador comercial *Broad* de BIO-RAD.

TAMPÓN DE LAEMMLI 1X: 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol y 0,05% (p/v) azul de bromofenol.

STOCK DE ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA: 30% (BIO-RAD)

TAMPÓN DE ELECTROFORESIS 10X: 30,3 g/l Tris base, 144,1 g/l glicina. Conservar a temperatura ambiente. Al tampón diluido se le añade SDS hasta una concentración final de 1 g/l antes de usar.

2.11.5. Detección de proteínas con azul de Coomassie

Inmediatamente después de la electroforesis, los geles se incubaron con agitación suave durante 20 minutos en una solución acuosa de azul de Coomassie. El exceso de colorante se eliminó mediante lavados sucesivos del gel en una solución decolorante.

AZUL DE COOMASSIE: 50% etanol (v/v), 10 % ácido acético (v/v), 40 % agua y 0,5 g/l de Coomassie (Coomassie brilliant blue R-250, SIGMA). Disolver el azul en etanol y luego añadir el resto. Filtrar usando un papel de filtro.

SOLUCIÓN DECOLORANTE: 33% etanol, 10% ácido acético, en agua.

2.11.6. Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa

La transferencia de proteínas de los geles de poliacrilamida-SDS a filtros de nitrocelulosa se realizó con una unidad "*Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell*" (BIO-RAD). Se aplicó un voltaje constante de 16 V durante 40 minutos. Las proteínas transferidas se visualizaron tiñendo la membrana durante 3 minutos con la solución de rojo Ponceau S y destiñéndolo con agua.

TAMPÓN DE TRANSFERENCIA 10X: 480 mM Tris Base, 390 mM Glicina, 20% Metanol, 0.037 % SDS. Para preparar 1l de tampón: 58.2 g Tris Base, 29.3 g Glicina; en el momento de usar, diluir hasta 1X con agua y añadir 200 ml de Metanol y 3.75 ml de SDS 10%.

SOLUCIÓN ROJO PONCEAU 1X: 0.5% Ponceau S en 1% de ácido acético glacial.

2.11.7. Inmunodetección

Previamente a la incubación con los anticuerpos, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave (o bien toda la noche a 4°C en el caso del anticuerpo anti-PTTG2). A continuación, se incubaron con los anticuerpos específicos a la dilución apropiada en el tampón de bloqueo durante 1 hora a 37 °C (para anti-PTTG2 esta incubación es previa a la

incubación a 4°C), durante 2 horas a temperatura ambiente o bien durante toda la noche a 4 °C (la incubación con los anticuerpos anti-PTTG1, anti-PTTG2 y anti-PTTG3 se realizó durante la noche a 4°C). A continuación, las membranas se lavaron durante 20 minutos (2 lavados de 10 minutos cada uno) con tampón TBS-T 1X. La incubación con los anticuerpos secundarios se realizó durante 1 h con agitación suave a temperatura ambiente. Se emplearon los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (Amersham Biosciences) a la dilución recomendada por el fabricante en tampón de bloqueo. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron 3 veces con tampón TBS-T 1X, 10 minutos cada vez, y se revelaron con el sistema ECL (*Enhanced Chemiluminescence*, GE).

TAMPÓN TBS-T 10X: 30 g/l Tris Base, 80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 1% Tween 20. Ajustado a pH 8.

TAMPÓN DE BLOQUEO: 5% (p/v) leche desnatada en polvo en TBS-T 1X.

2.12. Purificación de anticuerpos anti-PTTG1

Los anticuerpos anti-PTTG1, anti-PTTG2 y anti-PTTG3 se purificaron por dos métodos distintos para eliminar las señales inespecíficas detectadas en *western blot* e inmunofluorescencia:

2.12.1. Por cromatografía de afinidad en columna

La matriz *Sepharosa 4B* activada con bromuro de cianógeno (Sigma) se hidrató en una solución 1 mM de HCl y se lavó con 20 volúmenes de tampón carbonato. La matriz se mezcló a continuación con la proteína recombinante (PTTG1-His, PTTG2-His ó PTTG3-His, según los casos) en el mismo tampón carbonato. Se emplearon 2 mg de proteína total para 0.2 mg de matriz en el caso de PTTG1-His y 1 mg de proteína para 0.1 mg de matriz en el caso de PTTG2-His y PTTG3-His. La mezcla de matriz y proteína se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y a continuación a 4°C durante 16 horas, con agitación suave. Finalizada la incubación, se centrifugó a 3000 rpm durante 1

minuto y se recogió el sobrenadante para medir su densidad óptica y determinar la eficiencia de la unión. La matriz se lavó con 10 volúmenes de tampón carbonato y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con 0.1M de lisina para bloquear los sitios libres de acoplamiento. Se lavó de nuevo con tampón carbonato y posteriormente con tampón acetato. Se repitió este proceso y se mantuvo la resina en tampón carbonato (tampón de acoplamiento) como paso final antes de empaquetarla en una columna de cromatografía (el volumen final fue de 1 ml aproximadamente) que se guardó a 4°C.

Previamente al paso de los anticuerpos a través de la columna, se realizó una pre-elución de dicha columna. Se eluyó en primer lugar con 200 mM de glicina pH 2.5, se lavó posteriormente con 20 volúmenes de Tris 10 mM pH 8.8, y se volvió a eluir con 100 mM de Trietilamina (TEA) pH 11. Se repitió el lavado de la columna con 20 volúmenes de Tris 10 mM pH 7.5.

Los anticuerpos se diluyeron 1:10 en tampón Tris 10 mM pH 7.5 y se pasaron 3 veces por la columna empaquetada para optimizar la unión con el antígeno específico. Los anticuerpos se eluyeron pasando por la columna en primer lugar una solución salina (0.5M NaCl, 10 mM Tris pH 7.5) y luego empleando 200 mM glicina pH 2.5 (para eluir los anticuerpos unidos mediante interacciones ácidas) y 100 mM de TEA (para los unidos mediante interacciones básicas), lavando después de cada elución con Tris pH 8.8 y Tris pH 7.5 respectivamente. Para neutralizar la solución de anticuerpos, se añadió al eluido 1:10 de Tris pH 8, 1:10 de PBS 10X y 1:10 de BSA 10%.

Con las proteínas PTTG1 y PTTG3, las dos condiciones de elución (ácida y básica) resultaron eficientes para eluir el anticuerpo correspondiente; sin embargo, en el caso de PTTG2 sólo resultó eficiente la solución básica.

TAMPÓN CARBONATO: 0.2M NaHCO₃, 0.5M NaCl. Ajustado a pH 8.5 con NaOH 10 N y autoclavado.

2.12.2. Por cromatografía de afinidad en membrana de nitrocelulosa

Se resolvieron 400 µg de proteína recombinante en un gel preparativo de poliacrilamida-SDS. La proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa que se tiñó con rojo Ponceau y se recortó la banda correspondiente. La membrana cortada se incubó en solución de bloqueo durante 1 hora y posteriormente se incubó durante toda la noche con el anticuerpo correspondiente (anti-PTTG1, 2 ó 3) diluido 10 veces en la misma solución. A continuación se lavó la membrana con PBS 1X durante 20 minutos y con 0.2M de NaCl durante otros 20 minutos adicionales. Finalmente la membrana se incubó con 400 µl de glicina 0.2 M pH 2.5 durante 5-15 minutos. La solución que contenía el anticuerpo eluido se neutralizó con 50 µl de Tris pH 8. A continuación se añadieron 50 µl de una solución de PBS 10X, 50 µl de BSA 10% y azida sódica al 0.2 % final para su conservación.

2.13. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

Las células se recogieron tras los tratamientos correspondientes y se fijaron en etanol al 70% en PBS a 4°C. Tras la fijación durante toda la noche a 4°C, se empleó el *kit* "CycleTest Plus" (Becton Dickinson) siguiendo las instrucciones del fabricante, para incorporar yoduro de propidio al DNA celular y cuantificarlo mediante FACS (Becton Dickinson). La adquisición de los datos se realizó con el programa *CellQuest* y el análisis de los mismos con el programa *ModFit LT2*. Se analizaron un total de 10000 eventos por muestra.

SOLUCIÓN DE FIJACIÓN: 30% PBS, 70% Etanol, a 4°C

2.14. Subfraccionamiento celular

Las células (10^8) se lavaron con tampón PBS 1X y a continuación con tampón hipo-osmótico. Se rompieron a 4°C con tampón de homogeneización a razón de 1:9 v/v, empleando un homogeneizador *Dounce* de vidrio-vidrio esmerilado. Una vez comprobada la rotura al microscopio, se añadió una solución de sacarosa en Hepes hasta una concentración final de 0.32M. Después de separar los núcleos y restos celulares por centrifugación a 1000 x g durante 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante resultante se centrifugó a 8.000 x g durante 10 minutos, en una centrífuga preparativa *Beckman-Coulter*. Se obtuvo un sobrenadante S8 y un precipitado P8. El sobrenadante S8 se volvió a centrifugar a 10000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido, llamado P10, se resuspendió en 1 ml de tampón de aislamiento y se mezcló con el precipitado P8. A continuación, se sometió a ultracentrifugación (95.000 x g) durante 90 minutos a 4 °C, sobre un gradiente de sacarosa 1.6 - 0.8 M en 2 mM de Hepes pH 7.4 (el gradiente se formó con 2 ml de cada una de las soluciones de sacarosa). Las membranas se distribuyeron en las interfases del gradiente según su densidad y se extrajeron con jeringa las fracciones mitocondriales. Éstas se lavaron dos veces por centrifugación a 10000 x g durante 15 minutos para retirar la sacarosa. Se resuspendieron en tampón de aislamiento.

Por otra parte, el sobrenadante S10 se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 1 hora, obteniéndose un precipitado P100 y un sobrenadante S100. El sobrenadante S100 correspondiente al citosol celular contenía vesículas de fagocitosis y otras de tamaño muy pequeño. El nuevo precipitado P100 constituía la fracción microsomal. Dicha fracción se volvió a ultracentrifugar a 100000 x g en un gradiente de sacarosa (30% - 38%) construido sobre 2 mM de Hepes pH 7.4, durante 3 horas a 4 °C. Se separaron así el Retículo Endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi (P100-RE). P100-RE estaba constituido por las membranas que permanecieron en la fase al 30% de sacarosa y por las que no entraron en el gradiente. Ambas fracciones RE y P100-RE se resuspendieron en tampón de aislamiento.

Para eliminar las vesículas de menor tamaño del citosol y obtener una fracción citosólica pura, el sobrenadante S100 se ultracentrifugó a 350.000 x g durante toda la noche (S350). La pureza de las fracciones se comprobó por WB con marcadores específicos de cada fracción.

TAMPÓN HIPO-OSMÓTICO: 2 mM HEPES pH 7.4, 0.15 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM EGTA.

TAMPÓN DE HOMOGENEIZACIÓN: 2 mM HEPES pH 7.4, 0.15 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM EGTA, 20 μM Citocalasina B, 10 μg/ml de inhibidores de proteasas.

TAMPÓN DE AISLAMIENTO: 2 mM Hepes, pH 7.4, 0.32 M sacarosa.

2.15. Inmunofluorescencia indirecta

Se utilizaron monocapas de células adheridas a cubreobjetos. Las células se lavaron en PBS a 37 °C; a continuación, se fijaron en solución de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 minutos, o bien en metanol a -30 °C durante 6 minutos, dependiendo de las proteínas a analizar y de los anticuerpos utilizados. Para permeabilizar las células fijadas con PFA, se incubaron los cubreobjetos en una solución de tritón al 0.1% en PBS durante 10 minutos. La incubación con los anticuerpos primarios y secundarios se realizó a temperatura ambiente en solución de bloqueo durante 50-60 minutos y 30-45 minutos, respectivamente. A la mezcla de anticuerpos secundarios se añadió DAPI para colorear los núcleos celulares. Después de cada incubación, los cubreobjetos se lavaron en PBS-Tween 0.1%. Al finalizar el proceso, los cubreobjetos se incubaron en etanol absoluto durante 2 minutos y se secaron a temperatura ambiente. Como medio de montaje se usó n-propil-galato al 2% diluido en PBS 10% - glicerol 90%.

En aquellos casos en los que la proteína soluble se extrajo con digitonina ó tritón, después del primer lavado con PBS a 37°C, las muestras se incubaron durante 5 minutos en tampón NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM conteniendo 50 μg/ml de digitonina, o bien durante 1 minuto en tritón al 1%. A continuación se fijaron y permeabilizaron según el protocolo descrito.

SOLUCIÓN DE FIJACIÓN PFA: 4% de paraformaldehído en PBS. Disolver el PFA a 65 °C en agua añadiendo 1-2 μ l de NaOH 10N. Añadir PBS 10X hasta una concentración final de 1X. Ajustar el pH a 7-7.5 con HCl.

SOLUCIÓN DE PERMEABILIZACIÓN: 0.1% de tritón en PBS.

SOLUCIÓN DE BLOQUEO: PBS-Tween 0.1%, BSA 3%.

STOCK DAPI: 10 μ g/ ml. Se utiliza a una concentración final de 20 ng/ ml.

2.16. Obtención de lentivirus

Se emplearon las células empaquetadoras HEK A293T, que son células epiteliales embrionarias humanas de riñón. El día anterior a la transfección, las células se cultivaron en medio sin antibióticos en placas de 10 cm \varnothing para conseguir el 90% de confluencia al siguiente día. Se siguió el protocolo proporcionado por Invitrogen para la transfección de plásmidos con Lipofectamina 2000, empleando una cantidad total de DNA de 27 μ g.

Los vectores utilizados para la obtención de lentivirus fueron:

- * pHRSIN-CSGW-pttg1 ó bien pSINDUAL-GFP1-ipttg1: vectores lentivirales para expresar constitutivamente PTTG1 ó su iRNA, respectivamente.
- * pCMVDR 8.91: plásmido que contiene los genes necesarios para la producción de virus.
- * pMDG: plásmido que contiene el gen *vsv-g*, que codifica la glicoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular.

Los plásmidos se mezclaron en una proporción 3:2:1 según el orden expuesto. Así, se emplearon 13.5 μ g del vector lentiviral, 9 μ g del vector pCMVDR 8.91 y 4.5 μ g del pMDG. La solución conteniendo el complejo DNA-Lipofectamina se añadió a las células gota a gota. Se incubaron a 37 °C durante 6-7 horas, tiempo tras el cual se sustituyó el medio por 10 ml de DMEM sin antibióticos. Tras 72 horas de incubación, el medio de cultivo se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa de 45 μ m \varnothing para eliminar restos celulares, se distribuyó en criotubos y se almacenó a -80 °C.

Para la titulación de los lentivirus, se sembraron 200000 células HEK A293T por pocillo en placas de 12 pocillos y, una vez adheridas, se infectaron con 1, 10, 50, 100 y 200 μ l de virus por pocillo. Tras 48 horas de incubación, se analizó el porcentaje de células positivas para GFP por medio de microscopía o bien por citometría de flujo. La eficiencia de producción de virus fue de $4 \cdot 10^6$ partículas virales infectivas por ml.

Para las infecciones con los lentivirus, las células se plaquearon generalmente en pocillos de 35 mm \varnothing y se infectaron en su propio medio de cultivo utilizando una MOI de 0.5-1.

2.17. Inmunohistoquímica

Las muestras de tejido tumoral fueron obtenidas de material congelado y archivado. Las muestras de tejido placentario e hígado embrionario procedían de abortos espontáneos con 6 y 15 semanas de gestación. El estudio fue aprobado por el Comité Ético Local. Todos los tejidos fueron fijados en formalina y embebidos en parafina. Se tomaron secciones de 5 μ m, se deshidrataron, re-hidrataron y fueron sumergidas en 3% de peróxido de hidrógeno durante 30 minutos y cubiertas con 10% de suero de cerdo normal durante 15 minutos. Se llevó a cabo la recuperación antigénica por calor empleando una olla a presión y el tampón Tris-EDTA, pH 9. Las muestras fueron incubadas con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C. Las condiciones utilizadas con los anticuerpos secundarios y el sistema de visualización fueron los recomendados por el fabricante (*LSAB-HRP System y DAB+/Dako*). Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina y montadas en DPX (BDH Laboratorios). Las secciones donde se omitió el anticuerpo primario se utilizaron como control negativo.

2.18. Ensayos de diferenciación

La diferenciación de las células 3T3-L1 se llevó a cabo cultivándolas hasta confluencia (día -2) en el medio de cultivo apropiado (DMEM suplementado con 10% de suero NCS, una mezcla de penicilina/estreptomicina y glutamina). Tras dos días de confluencia (día 0), se sustituyó el medio por otro que contenía suero FBS en vez de NCS, 1 μ M de dexametasona, 0.5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), y 15 μ g/ml de insulina porcina. El medio se sustituyó tras 48 horas por otro conteniendo sólo insulina (15 μ g/ml) (día 2). La tinción con rojo oleoso se realizó los días 7^o y 10^o del proceso de diferenciación. Las células se lavaron con PBS a 37 °C, se sumergieron durante 15 minutos en solución de rojo oleoso y finalmente se lavaron con agua destilada. Los oligonucleótidos de interferencia iDLK1 y control se transfectaron el día 7.

SOLUCIÓN DE ROJO OLEOSO: 250 mg en 100 ml de isopropanol.

2.19. Coimmunoprecipitación

Esta técnica permite detectar la interacción *in vivo* de proteínas. El anticuerpo reconoce su antígeno específico en forma nativa y con las bolas de sefarosa unida a proteína A (que reconoce la fracción constante ó Fc del anticuerpo) se extrae, a partir de un extracto celular, el antígeno junto con las proteínas con las que interacciona.

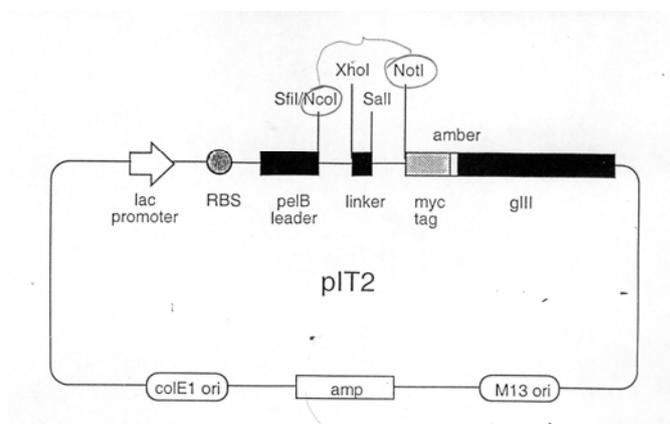
Los experimentos de inmunoprecipitación (IP) se realizaron empleando extractos obtenidos con NP-40. Se utilizaron de 0.5 a 1mg de proteína total por ensayo. En primer lugar se hizo un paso de preclarado o limpieza mediante incubación del extracto proteico con 20 μ l de matriz sefarosa-proteína A, durante 2 horas a 4°C con agitación rotatoria. La mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 1 minuto y se recogió el sobrenadante (las bolas de sefarosa, una vez lavadas 4 veces con tampón NP40, se incubaron a 95°C en laemli 1X para su análisis posterior en WB). La inmunoprecipitación propiamente dicha se hizo añadiendo 1/100 volumen de suero inmune respecto al volumen de extracto a

20 μ l de bolas-proteína A, e incubándolo durante 2 horas a 4°C y posteriormente, tras varios lavados con el tampón NP40, añadiendo el extracto preclarado e incubándolo durante la noche a 4°C con agitación rotatoria. En paralelo se hizo una incubación con suero preimmune en las mismas condiciones, que sirvió como control de especificidad. Se centrifugó a 3000 rpm durante 1 minuto y se retiró el sobrenadante. La matriz de sefarosa-proteína A se lavó 6 veces con tampón NP-40. Las proteínas inmunoprecipitadas se solubilizaron añadiendo tampón laemli 1X y calentado a 95°C durante 5 minutos. Finalmente, se analizaron las muestras por WB.

2.20. Obtención de nuevos anticuerpos frente a PTTG1 por la técnica del *Phage display*

Para el aislamiento del anticuerpo monocatenario anti-PTTG1 (3F3), se utilizó la genoteca “I+J” generada por Tomlinson del *Center for Protein Engineering* de Cambridge, (Wildt RM *et al* 2000).

Los fragmentos scFv clonados en el vector pIT2 están bajo el control del promotor Lac Z, inducible por IPTG. El sitio de clonaje de los scFv está en fase con un péptido señal (pelB) que permite la acumulación de la proteína codificada en el periplasma, seguido de un codón stop “ámbar” y de la secuencia del gen *g3p*, que codifica la proteína pIII de la cápsida del bacteriófago M13.



Para el aislamiento de los fagos específicos que contienen los fragmentos scFv que reconocen la proteína PTTG1, así como para la obtención de los anticuerpos monocatenarios correspondientes, se siguió el protocolo pormenorizado que se adjuntaba con la genoteca.

V. RESULTADOS

CAPÍTULO 1º

“IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA PTTG1 EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *dIk1* EN PROCESOS DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN”

1. DETERMINACIÓN, A NIVEL TRANSCRIPCIONAL Y TRADUCCIONAL, DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *dIk1* EN LÍNEAS CELULARES QUE SOBREENPRESAN PTTG1

Como se ha comentado en la introducción, la proteína PTTG1 posee una potente capacidad transactivadora. De hecho, se han descrito una serie de genes cuya expresión se afecta por PTTG1, que están implicados directamente en tumorigénesis así como en otros procesos celulares (*Domínguez, A. et al., 1998; Wang, Z. et al., 2000; Pei, L. 2001; Chien, W. et al., 2000; Tong, Y. et al., 2007*).

Por ello, un objetivo de este trabajo ha sido estudiar los cambios de expresión génica producidos por la sobreexpresión de PTTG1 en células no tumorales. Se utilizaron células inmortalizadas NIH3T3 establemente transfectadas con el gen *pttg1*, bajo un promotor inducible por IPTG (*Wyborski and Short, 1991*). Mediante *northern* y *western blots* se analizó la expresión regulada del gen *pttg1*. El mRNA *Pttg1* era indetectable en células crecidas en ausencia de IPTG, pero la adición al medio de cultivo de IPTG a una concentración final de 4mM traía consigo la inducción del transcrito *Pttg1* de 0.7 kb (**Figura 1A**).

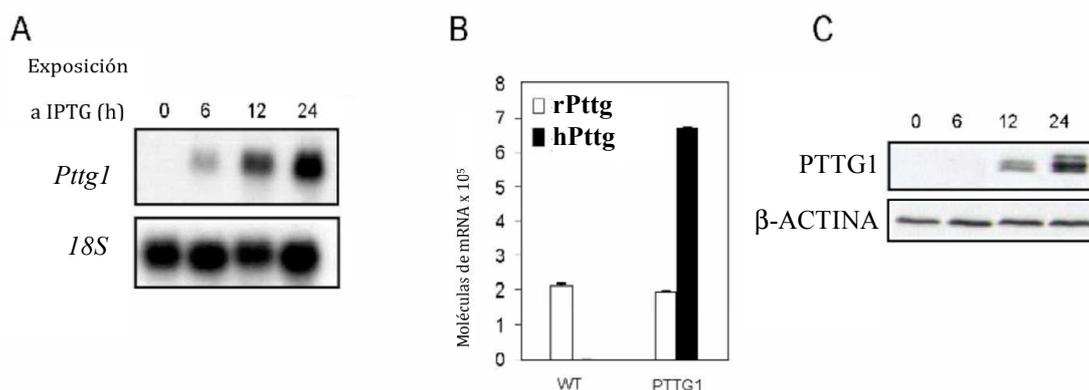


Figura 1. Expresión inducible de Pttg1. **A.** Northern blot que muestra los niveles de mRNA de Pttg1 tras 6, 12 y 24 horas de tratamiento con IPTG. **B.** Cuantificación del RNA mensajero de PTTG de ratón (rPttg) y de PTTG humana (hPttg) en células control NIH3T3 (WT) y en células sobreexpresando PTTG1 (PTTG1), después de 24 horas de tratamiento con IPTG. **C.** Western blot que muestra la expresión de PTTG1 inducida tras las horas de tratamiento con IPTG indicadas.

El análisis cuantitativo de los transcritos endógenos de Pttg de ratón y los inducidos por IPTG, reveló que al cabo de 24 h de inducción el nivel de los transcritos era cuatro veces mayor en células tratadas con IPTG que en células no tratadas (**Figura 1B**). El análisis de la expresión de proteína, utilizando anticuerpos específicos contra PTTG1, mostró la inducción de la proteína completa PTTG1 tras el tratamiento con IPTG (**Figura 1C**).

Los niveles de proteína se determinaron utilizando anticuerpos específicos y proteína PTTG purificada tanto murina como humana. Las células NIH3T3 no tratadas contenían 14 pg de PTTG por μg de proteína total, y esta concentración era 9,5 veces mayor tras 24 h de tratamiento con IPTG. Para determinar el efecto de la inducción de PTTG en las células NIH3T3, se midieron los niveles de proliferación celular así como el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. No se observaron diferencias significativas entre las células inducidas y no inducidas (**Figura 2A y 2B**).

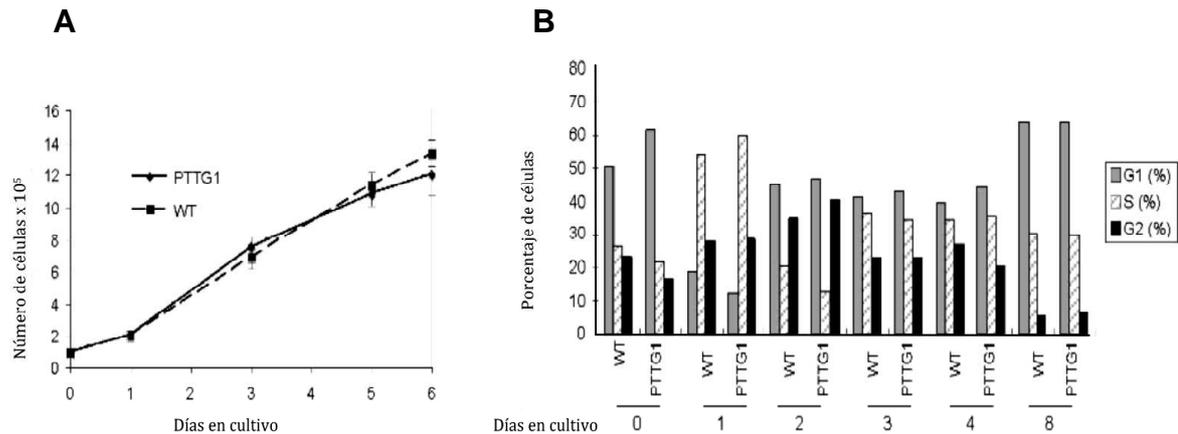


Figura 2. Efectos de la sobreexpresión de PTTG1 sobre el crecimiento celular. A. Tasa de proliferación a diferentes tiempos de células control (WT) y de células que sobreexpresan PTTG1 (PTTG1). Los valores son la media de tres ensayos independientes empleando tres clones distintos de cada línea celular. Las barras de error indican el error estándar. **B.** Porcentaje de células NIH3T3 controles (WT) y sobreexpresando PTTG1 (PTTG1) en las diferentes fases del ciclo y a varios intervalos de tiempo tras la adición de IPTG al medio de cultivo.

En experimentos previos, nuestro grupo de investigación demostró que el dominio carboxi-terminal de PTTG1 tiene capacidad transactivadora. Estos experimentos se realizaron utilizando levaduras y células de mamífero como modelos biológicos y transfecciones transitorias de construcciones conteniendo los genes marcadores β -galactosidasa y luciferasa (*Domínguez et al., 1998*). Estos resultados sugerían para PTTG1 una función en la regulación transcripcional.

En este trabajo se han utilizado las técnicas de *Differential Display* (*Liang y Pardee, 1992*) y la hibridación de *Arrays de cDNAs* para determinar genes cuya expresión se afecta tras la expresión inducible de PTTG1. En el caso del *Differential Display* (DD), se compararon los patrones de expresión génica de células NIH3T3-pttg1 tras 0, 6, 12 y 24 horas de la adición de IPTG al medio de cultivo, y se empleó una combinación de 32 cebadores aleatorios (AP 1, AP 2,... AP 32). En el caso de los *Arrays de cDNAs*, se comparó el patrón de expresión génica de células control NIH3T3-cat tratadas con IPTG

durante 24 horas con el de las células NIH3T3-pttg1 en idénticas condiciones (**Figura 3A y B**). Se identificaron 67 cDNAs diferentes (**TABLA 1**) y se obtuvieron sondas radiactivas de cada uno de ellos para confirmar por *northern blot* su expresión diferencial. De estos genes, 20 mostraban una expresión diferencial y la mayoría de ellos no habían sido identificados previamente como genes dianas de PTTG1.

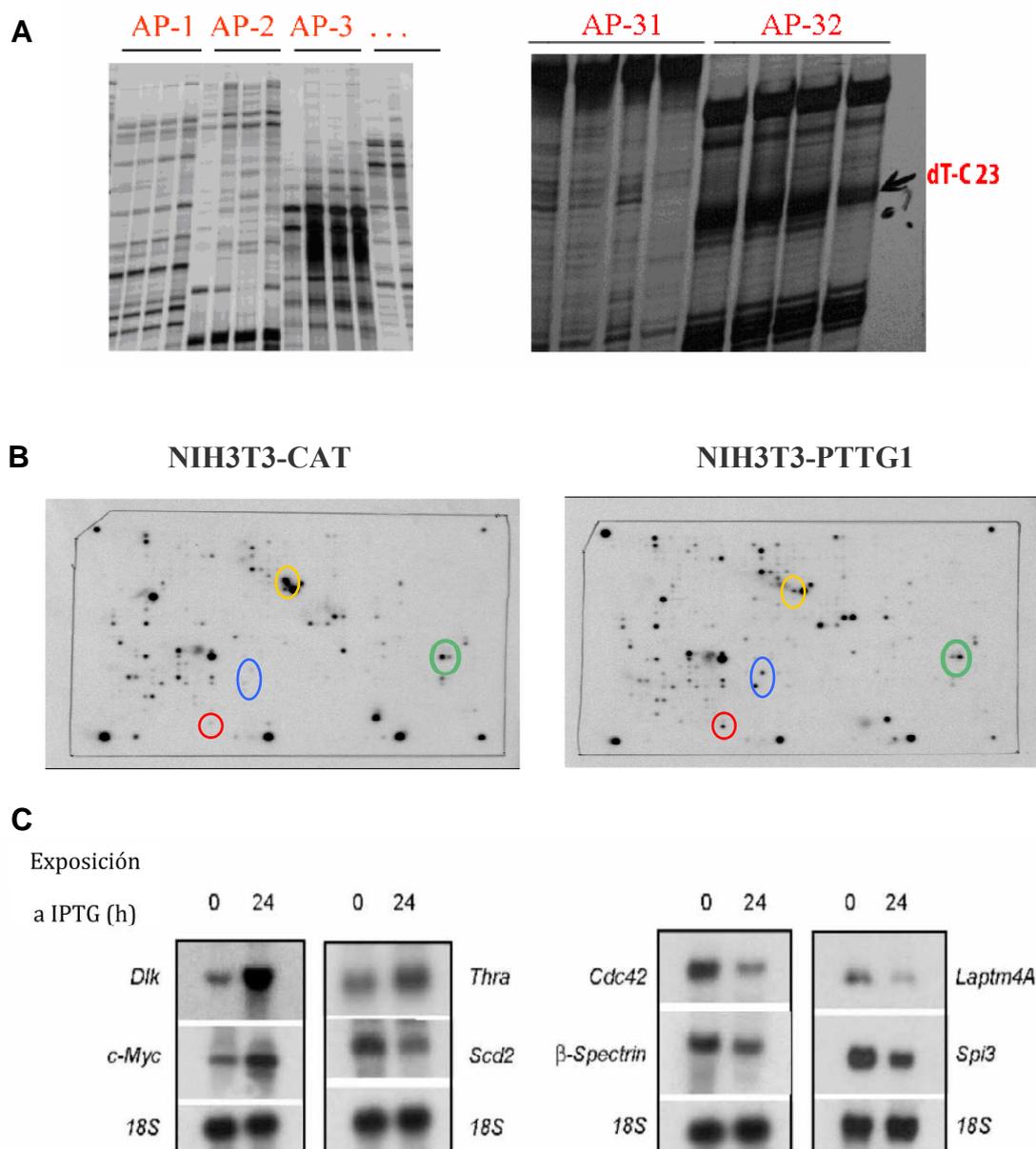


Figura 3. Análisis de los genes diana candidatos de PTTG1. A. Sección representativa de un gel de poliacrilamida mostrando los patrones de expresión génica correspondientes a las cuatro condiciones estudiadas mediante *Differential Display* (NIH3T3-pttg1 a las 0, 6, 12 y 24

horas de tratamiento con el inductor IPTG). **B.** Imágenes de un *Array* de células control NIH3T3CAT tras 24 horas de tratamiento con IPTG y de células NIH3T3-pttg1 en idénticas condiciones. Se han enmarcado algunas de las señales más significativas. **C.** *Northern blot* representativo de los genes diana aislados. Se analizó el RNA total de células NIH3T3 sobreexpresando PTTG1 en presencia o ausencia de IPTG durante 24 horas. Se utilizaron sondas específicas para dichos genes diana.

Entre los genes diferencialmente expresados se encuentran los oncogenes *c-myc* y *mcl-1*, el gen supresor de metástasis *nm-23*, genes que codifican proteínas de la matriz celular como procolágeno o inhibidores de la serín-proteasa 3 (*spi3*), así como genes implicados en el movimiento de orgánulos celulares y del citoesqueleto en general, como *dineína*, *p190RhoGAP* y *cdc42* (**Figura 3C**).

TABLA 1. Resumen de genes cuya expresión se afecta por la sobreexpresión de PTTG1

| <i>Nº de acceso</i> | <i>Genes aislados por DD</i> | <i>Identidad</i> |
|---------------------|---|------------------|
| gi 6678955 | Proteína transmembrana 4a asociada a lisosoma (Laptn 4a) | 81/ 86 (94%) |
| gi 1514697 | Proteína quinasa p160 ROCK-2 asociada a Rho | 89/ 90 (98%) |
| gi 13938634 | Esteroil-coenzima A desaturasa 1 | 89/ 97 (91%) |
| gi 5118667 | Trombospondina (THBS1) | 87/ 94 (92%) |
| gi 604031 | Esteroil-coenzima A desaturasa 2 | 87/ 93 (93%) |
| gi 4102882 | Espectrina beta no eritrocitaria (Spnb2) | 86/ 94 (91%) |
| gi 17390357 | Miembro 3 de la familia 25 de transportadores de soluto mitocondriales | 147/ 150 (98%) |
| gi 813176 | MDM2 | 50/ 50 (100%) |
| gi 14017763 | Gen activador del proteosoma | 69/ 74 (93%) |
| gi 2275034 | Homeodominio de la proteína Meis 2d | 62/ 62 (98%) |
| gi 9910163 | Proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina 1 (Dcamk11), mRNA | 118/ 122 (96%) |
| gi 200581 | Tirosín-fosfatasa (PTP-1) | 113/ 115 (98%) |
| gi 205901 | p190RhoGAP | 134/ 147 (91%) |
| gi 14329711 | Proteína Tpr asociada al complejo de poro nuclear | 68/ 74 (92%) |
| gi 1297310 | Proteína relacionada a Atrofina-1 (rARP) | 80/ 85 (94%) |
| gi 12858376 | Clon 9130005N08 homólogo al factor de elongación de rata | 113/ 116 (97%) |
| gi 12857797 | Clon 6330417G11: homólogo a HSPC223 (<i>Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase-phosphopantheynyl transferase</i>) | 87/ 90 (96%) |

| | | |
|--------------------|---------------------------|-------------------|
| gi 16158147 | Proteína KIAA0729 | 90/ 90 (100%) |
| gi 13529364 | Mcl-1 | 233/ 234 (99%) |
| gi 9800521 | Factores GTF2I y GTF2IRD1 | 55/ 60 (91%) |

| <i>Nº de acceso</i> | <i>Genes aislados por Array de cDNA</i> |
|---------------------|---|
| NM_009011 | Proteína de reparación por escisión Rad23B |
| NM_009019 | Rag 1 |
| NM_011951 | MAP quinasa p38 |
| NM_009861 | CDC42 |
| AAC14343 | 14-3-3 beta |
| NM_009254 | Inhibidor de la Serín-proteasa 3 (Spi 3) |
| BC129879 | Cadena ligera de la dineína citoplásmica 1 |
| NM_009768 | Precursor de la Basiginina |
| NM_008704.2 | NM-23 |
| NM_010052 | Proteína homóloga a Delta Dlk1 |
| NM_178060 | Receptor alpha 1 de la hormona tiroidea (Thra) |
| J04806 | Precursor de Osteopontina (Op) |
| NM_001177352 | c-myc |

* Mediante sombreado se marcan los genes confirmados por *northern blot*: el color gris representa los genes reprimidos y el color amarillo los inducidos.

Entre los genes que se expresan diferencialmente tras la sobreexpresión de PTTG1, el gen *dlk1*, también denominado *pref-1*, era el que mostraba una inducción mayor. Este gen codifica una proteína homeótica perteneciente a la familia EGF (*Epidermal Growth Factor*) que participa en diferentes procesos de diferenciación, como adipogénesis (*Laborda et al., 1993; Garcés et al., 1999; Ruiz-Hidalgo et al., 2002; Abadía et al., 2004*) y hematopoyesis y está implicado en el desarrollo embrionario (*Nakakura et al., 2008; Wu et al., 2008*). Este gen se expresa abundantemente en neuroblastomas, carcinomas de pulmón y tumores endocrinos, lo que sugiere que pueda estar involucrado en procesos tumorigénicos (*Yin et al., 2005*).

Una vez determinados mediante *northern blots* los niveles de mRNA Pttg1 tras 6, 12 y 24 horas de tratamiento con IPTG, se estudiaron en paralelo los niveles del mRNA Dlk1, utilizando como sonda el cDNA Dlk1 (**Figura 4A**).

Así mismo, se determinaron por *western blot* los niveles de ambas proteínas tras el tratamiento con IPTG (**Figura 4B**).

Para confirmar que los resultados obtenidos eran extrapolables a otros tipos celulares, se determinó la expresión de DLK1 en la línea celular humana HCT116, de origen epitelial y proveniente de un adenocarcinoma de colon. La expresión de PTTG1 en estas células mediante infección con lentivirus que contienen el gen *pttg1* bajo un promotor constitutivo traía consigo también niveles mayores de proteína DLK1 (**Figura 4C**).

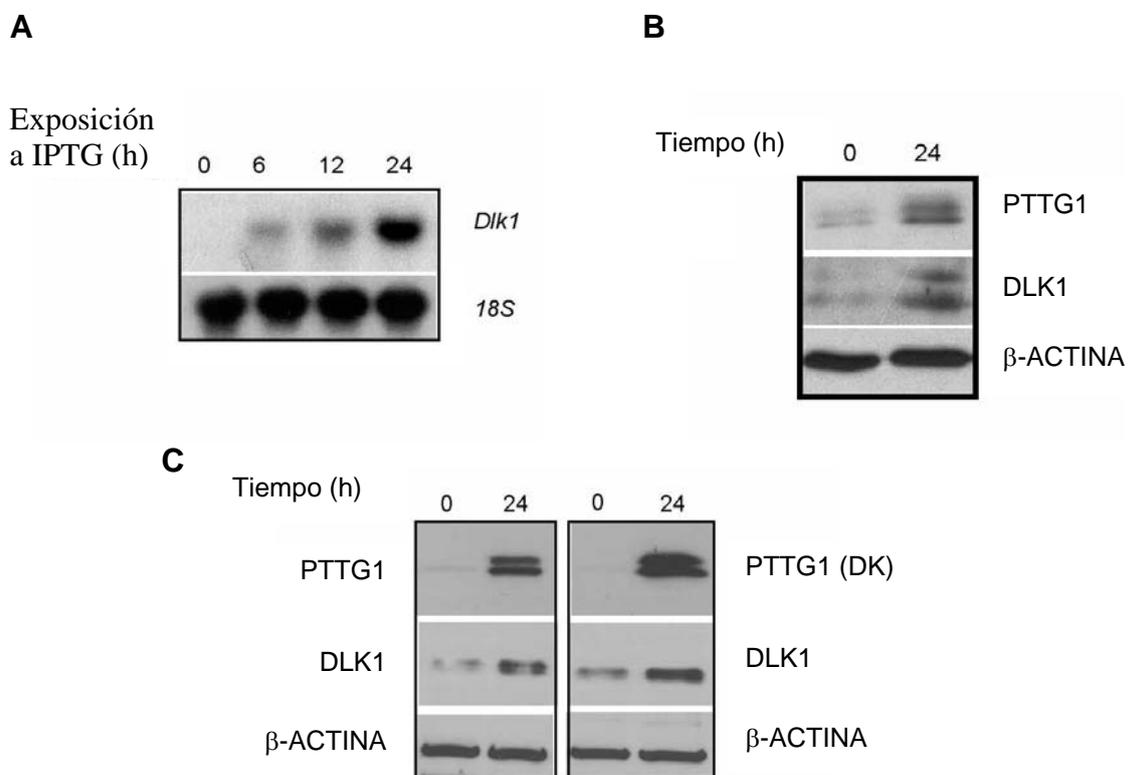


Figura 4. Inducción de Dlk1 por Pttg1. **A.** *Northern blot* que muestra los niveles de mRNA de Dlk1 tras 6, 12 y 24 horas de tratamiento con IPTG. **B.** *Western blot* que muestra el nivel de proteína DLK1 tras 24 horas de inducción de PTTG1 en células NIH3T3, **C.** Las proteínas PTTG1 y PTTG1-DK se sobreexpresaron en células humanas HCT116 y se analizaron los niveles de proteína DLK1 a las 24 horas.

Para estabilizar la proteína PTTG1 y así conseguir niveles intracelulares más elevados, se mutaron mediante mutagénesis dirigida los residuos específicos implicados en su ubiquitinación, generando la proteína que denominamos PTTG1-DK. Estos residuos forman parte de las cajas denominadas KEN y Destrucción constituidas por los residuos KEN y RKALGTV, respectivamente. La no ubiquitinación de PTTG1 impide su procesamiento por el proteosoma, acumulándose dentro de la célula. En la sección Materiales y Métodos se detallan los residuos mutados y la metodología utilizada. La inducción de DLK1 se analizó en la línea celular HCT116 que sobreexpresaba la proteína mutada PTTG1-DK (**Figura 4C**).

Estos experimentos confirman que la sobreexpresión de PTTG1 induce la expresión de Dlk1 tanto en las células de fibroblastos de ratón inmortalizadas NIH3T3 como en células epiteliales humanas de adenocarcinoma de colon.

2. EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE *pttg1* SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE PREADIPOCITOS

DLK1 es un regulador de la adipogénesis. La diferenciación de preadipocitos NIH3T3-L1 en adipocitos constituye un sistema simple e idóneo para estudiar este proceso. Se lleva a cabo fácilmente añadiendo a las células un medio de diferenciación que contiene dexametasona, isobutilmetilxantina e insulina, observándose al cabo de 7 días la diferenciación de preadipocitos en adipocitos. La expresión constitutiva de *dlk1* en células NIH3T3-L1 inhibe la diferenciación de éstas en adipocitos, mientras que la supresión de la expresión de *dlk1* induce el proceso de adipogénesis (*Smas et al., 1999; Smas y Sul, 1993*).

Para investigar el efecto de la sobreexpresión de PTTG1 sobre la adipogénesis, se infectaron células NIH3T3-L1 con lentivirus específicos que contenían el gen *pttg1* bajo un promotor constitutivo. Las células fueron

cultivadas hasta confluencia (**Figura 5A, panel 1**) y posteriormente inducidas a diferenciarse mediante el medio de cultivo apropiado. Las células infectadas con un virus control se diferenciaron al cabo de los 7 días del tratamiento, mostrando la acumulación de lípidos y la tinción con rojo oleoso característica de éstos (**Figura 5A, paneles 2, 4**, correspondientes a 7 y 10 días de tratamiento respectivamente). Sin embargo, las células NIH3T3-L1 que habían sido infectadas con el virus conteniendo el gen *pttg1*, acumulaban claramente menos lípidos que las células control (**Figura 5A, paneles 3, 5**). Este efecto fue revertido tras el bloqueo del mRNA Dlk1 a partir del día 7 de diferenciación mediante iRNA específico, manteniendo la sobreexpresión de PTTG1 (**Figura 5A, panel 6**).

Paralelamente, se determinaron por *western blot* los niveles de proteína PTTG1 y DLK1 durante el proceso de diferenciación mostrado en la inmunohistoquímica (**Figura 5B**). Las líneas 1 y 2 corresponden a cultivos en confluencia infectados con lentivirus control y con lentivirus PTTG1 respectivamente. Las líneas 3 y 5 corresponden a cultivos control tras 7 y 10 días de diferenciación respectivamente. Las líneas 4 y 6 corresponden a cultivos tras 7 y 10 días de tratamiento respectivamente, infectados con lentivirus que contienen el gen *pttg1*. La línea 7 refleja el nivel de proteína de un cultivo tras 10 días de tratamiento, infectado con el lentivirus portador de *pttg1*, y que tras los primeros 7 días de tratamiento ha sido interferido durante 3 días con un iRNA específico contra Dlk1.

Estos datos indican que PTTG1 bloquea la diferenciación de las células NIH3T3L1 y que esta inhibición se lleva a cabo mediante la inducción de Dlk1. Hay que resaltar que la sobreexpresión de PTTG1 también inhibe, como se ha mencionado anteriormente, la expresión de los genes *scd1* y *scd2* (*stearoyl-CoA desaturase*), específicos de adipocitos (**Tabla 1 y Figura 3C**).

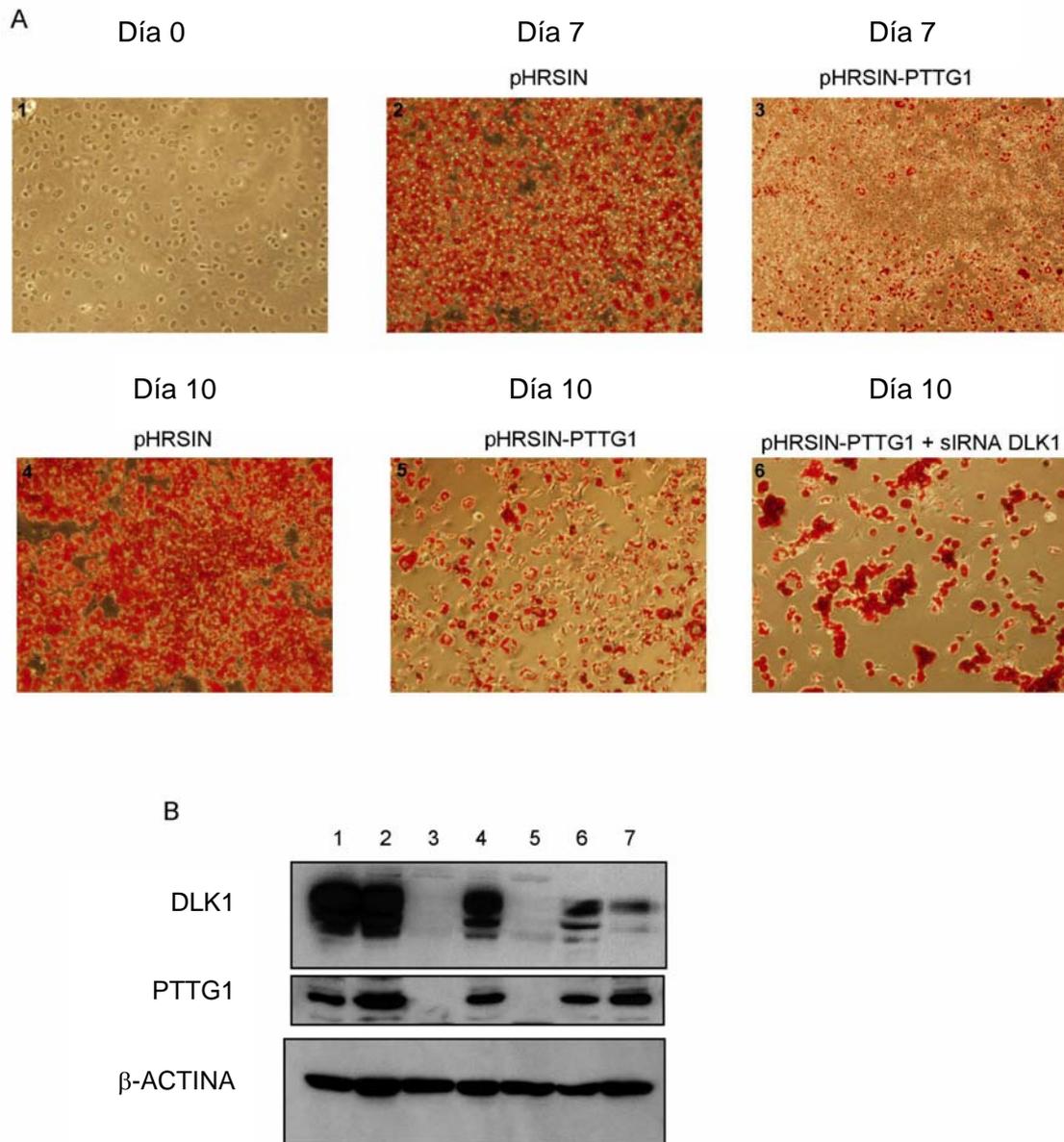


Figura 5. Niveles elevados de PTTG1 inhiben la diferenciación de los preadipocitos. A. Tinción con rojo oleoso de los gránulos de grasa a los días 7 (**paneles 2 y 3**) y 10 (**paneles 4-6**) de diferenciación. Las células mostradas en los paneles 2 y 4 se indujeron a diferenciarse después de la infección con lentivirus control pHRSIN, mientras que las mostradas en los paneles 3, 5 y 6 fueron infectadas con lentivirus pHRSIN-PTTG1 previo a la diferenciación. Las células del panel 6 se transfectaron con DLK1 siRNA el día 7 de diferenciación y se tiñeron con rojo oleoso el día 10. El panel 1 muestra el marcaje con rojo oleoso de células no diferenciadas. **B.** Análisis de los niveles de proteína DLK1, PTTG1 y β -ACTINA (control de carga) en preadipocitos de ratón 3T3L1 cultivados bajo condiciones inductoras de la diferenciación. La línea 1 corresponde a células el día 0 de diferenciación. Las líneas 3 y 5 corresponden a células infectadas con pHRSIN (control) después de 7 y 10 días de

diferenciación respectivamente. Las líneas 2, 4 y 6 corresponden a células infectadas con pHRSIN-PTTG1 después de 0, 7 ó 10 días de tratamiento inductor de diferenciación. La línea 7 corresponde a células infectadas con pHRSIN-PTTG1 después de 10 días de diferenciación pero transfectadas el día 7 de tratamiento con un siRNA específico de Dlk1.

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE DLK1 EN TEJIDOS NORMALES. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA EXPRESIÓN DE PTTG1 Y DLK1 EN TEJIDOS NORMALES

Para analizar la relación entre la expresión de *dlk1* y *pttg1*, se analizó por *northern blot* la expresión del gen *dlk1* en órganos y tejidos humanos no tumorales: corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas. Se utilizó como sonda el fragmento de cDNA Dlk1. Como control interno de carga se utilizó la sonda de *β-actina*. El transcrito Dlk1 fue detectado principalmente en placenta (**Figura 6**), tejido en donde Pttg1 se expresa abundantemente.

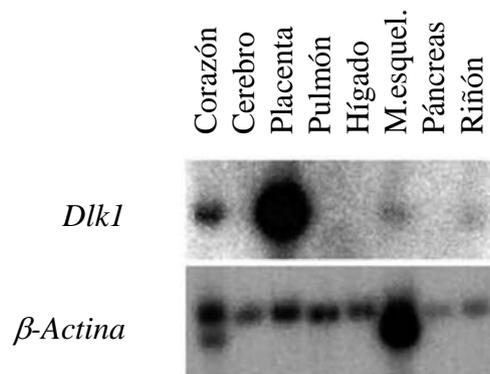


Figura 6. Expresión de Dlk1 en tejidos humanos adultos.

El *northern blot* muestra la hibridación del mRNA poli (A)+ de diferentes tejidos adultos humanos (*Clontech*) con sondas específicas de Dlk1 y β -actina.

La expresión de las proteínas PTTG1 y DLK1 se estudió mediante técnicas inmunohistoquímicas, observándose que estas proteínas se localizan en las mismas células del sincitio-trofoblasto de placenta de 6 semanas (**Figura 7, paneles A –PTTG1- y B –DLK1-**). Expresión paralela de estas proteínas se

observó en hígado embrionario humano de 6 semanas (**Figura 7, paneles C y D**) en donde ambas proteínas se expresan abundantemente.

La pérdida de expresión de la proteína DLK1 como consecuencia del desarrollo del hígado (hígado embrionario de 15 semanas) también coincide con la ausencia de señal específica de PTTG1 (**Figura 7, paneles E -PTTG1- y F -DLK1-**).

Estos datos sugieren la implicación de DLK1 y PTTG1 en el desarrollo embrionario y apoyan la hipótesis de que PTTG1 podría regular al gen *dlk1* en los procesos de diferenciación y desarrollo.

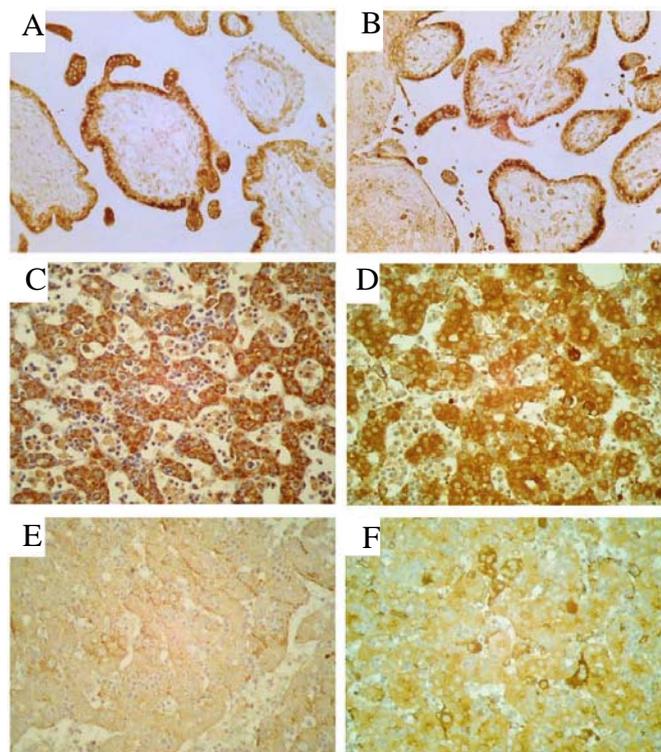


Figura 7. Expresión inmunohistoquímica de PTTG1 (A, C y E) y DLK1 (B, D y F) en placenta humana (A, B), hígado humano de 6 semanas (C, D) y de 15 semanas de gestación (E, F).

4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE Pttg1 Y DLK1 EN ADENOMAS DE PITUITARIA, ADENOCARCINOMAS DE MAMA Y NEUROBLASTOMAS

Este estudio se realizó con muestras tumorales archivadas embebidas en parafina. Se analizaron 21 muestras de adenomas de hipófisis, 23 de adenocarcinomas de mama y 15 de neuroblastomas. Se clasificaron dichas muestras de acuerdo a su inmunotinción, utilizando anticuerpo anti-PTTG1, según fuese intensa, baja o nula. Se realizó paralelamente la inmunotinción de DLK1, utilizando un anticuerpo específico, y la clasificación de las muestras según la intensidad de la inmunotinción. Se analizó la asociación entre la expresión de ambos genes.

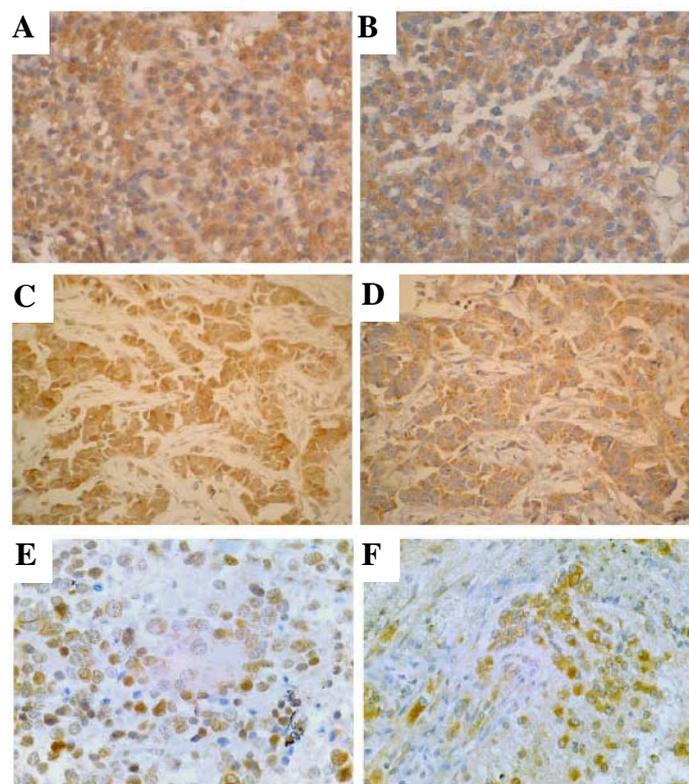


Figura 8. Inmunohistoquímica de PTTG1 (A, C, E) y DLK1 (B, D, E) en adenomas de hipófisis (A, B) 400X, adenocarcinomas de mama (C, D) 200X y neuroblastomas (E, F) 400X.

En los adenomas de hipófisis, el marcaje de PTTG1 era nuclear y citoplásmico en 14 de 21 casos y sólo citoplásmico para DLK1 en 13 de los casos (**Figura 8, paneles A –PTTG1- y B –DLK1-**). En 23 adenocarcinomas de mama analizados, la expresión de PTTG1 y DLK1 era elevada en 16 y 10 muestras respectivamente (**Figura 8, paneles C –PTTG1- y D –DLK1-**). En 15 neuroblastomas analizados, la inmunohistoquímica mostró que existían niveles elevados de PTTG1 y DLK1 en 9 y 7 muestras respectivamente (**Figura 8, paneles E –PTTG1- y F –DLK1-**). Se observó correlación en la expresión de ambas proteínas en 80.9% de los adenomas de hipófisis, 73.9% de los adenocarcinomas de mama y 80% de los neuroblastomas.

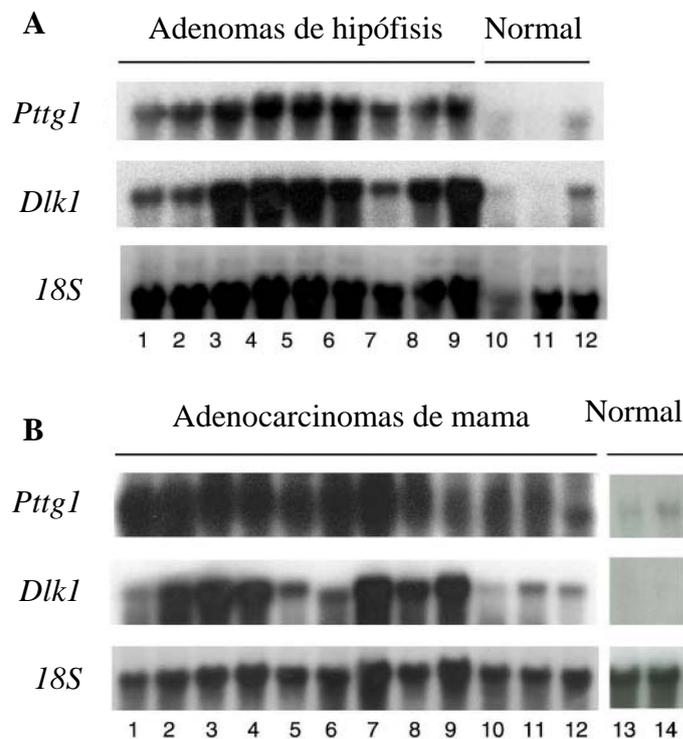


Figura 9. Northern blots que muestran la expresión del mRNA de *Pttg1* y *Dlk1* en adenomas de hipófisis (A) y adenocarcinomas de mama (B).

Posteriormente, se corroboró mediante *northern blot* que estos genes se sobreexpresaban en la mayoría de las muestras tumorales analizadas, siendo

su expresión muy baja en las muestras normales (**Figura 9A** –adenomas de hipófisis-) y **B** –adenocarcinomas de mama-).

Un aspecto interesante de este estudio era determinar el grado de diferenciación de las células que constituían el tumor, ya que un mayor o menor grado de diferenciación celular está correlacionado con una mayor o menor agresividad del tumor. Aunque el número de muestras analizadas no es suficiente para realizar un estudio estadístico consistente, sin embargo, los resultados presentados en las figuras anteriores, así como los de la Tabla 2, sugieren que existe una correlación positiva entre la expresión de PTTG1 y DLK1 y que esta expresión, según estos datos preliminares, estaría correlacionada con la agresividad del tumor y, por tanto, con una menor diferenciación celular.

TABLA 2. Niveles de proteína PTTG1 y DLK1 en adenomas de hipófisis y adenocarcinomas de mama

| ADENOMAS | DLK | PTTG1 |
|----------|-----|-------|
| GH | 1 | 1 |
| NF | 1 | 1 |
| ACTH | 1 | 1 |
| NF | 1 | 1 |
| NF | 0 | 1 |
| NF | 0 | 1 |
| NF | 1 | 1 |
| GH | 0 | 0 |
| GH | 1 | 1 |
| NF | 0 | 0 |
| NF | 1 | 0 |
| GH | 0 | 0 |
| ACTH | 1 | 1 |
| NF | 1 | 1 |
| GH | 1 | 1 |
| NF | 0 | 0 |
| ACTH | 0 | 0 |
| NF | 1 | 1 |

| CARCINOMAS | DLK | PTTG1 | GRADO | GANGLIOS |
|------------|-----|-------|-------|----------|
| 1 | 1 | 1 | 3 | 1 |
| 2 | 1 | 1 | 3 | 1 |
| 3 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 5 | 1 | 1 | 3 | 1 |
| 6 | 1 | 1 | 3 | 1 |
| 7 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 8 | 0 | 1 | 3 | 1 |
| 9 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 10 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 12 | 0 | 1 | 2 | 1 |
| 13 | 1 | 1 | 3 | 1 |
| 14 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 15 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 16 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 17 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 18 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| 19 | 0 | 1 | 2 | 1 |
| 20 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 21 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 22 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 23 | 0 | 1 | 3 | 1 |

1: expresión elevada. Presencia de células tumorales en ganglios

0: expresión baja. Ausencia de células tumorales en ganglios

GRADO (del tumor): 1-bajo, 2-medio, 3-alto

CAPÍTULO 2º

“LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PTTG1”

1. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PTTG1

Los datos bibliográficos sobre la localización de PTTG1 tanto en células normales como tumorales son confusos y existen diferencias notables entre ellos dependiendo del sistema celular empleado. Por ello, nos propusimos estudiar detalladamente la localización subcelular de PTTG1 en las distintas etapas del ciclo celular y en diferentes condiciones.

Se obtuvieron inicialmente tres anticuerpos policlonales frente al fragmento carboxilo-terminal de PTTG1, que se denominaron α -PTTG1carb14, α -PTTG1carb16 y α -PTTG1carb18. Estos anticuerpos reconocían en WB su antígeno específico de 29 KDa, y dos bandas adicionales de 66 y 98 KDa (**Figura 10A**). Para evitar señales inespecíficas en las inmunocitoquímicas, el anticuerpo que presentaba mayor afinidad por su antígeno (α -PTTG1carb14) se purificó mediante cromatografía de afinidad. Para ello, la proteína purificada PTTG1-His (PTTG1 unida a seis residuos de histidina) se unió covalentemente a una matriz de sefarosa 4B activada con CNBr, a través de la cual, posteriormente, se pasó el anticuerpo diluido 10 veces.

Se analizaron por WB los eluidos de dicha matriz con pH ácido (glicina 100 mM, pH 2.5) y con pH básico (Trietilamina -TEA- 100 mM, pH 11.5). Ambos eluidos conservaban su afinidad por el antígeno (**Figura 10B**). Así mismo, se purificó el anticuerpo específico α -PTTG1carb14 mediante incubación con una membrana de nitrocelulosa que contenía 400 μ g de antígeno PTTG1-His. El anticuerpo purificado reconocía la banda de 29 KDa pero no las bandas de 66 y 98 KDa (**Figura 10B, carril 5**).

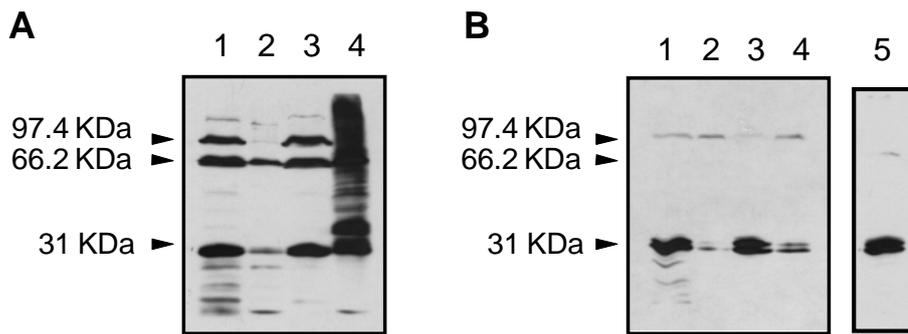
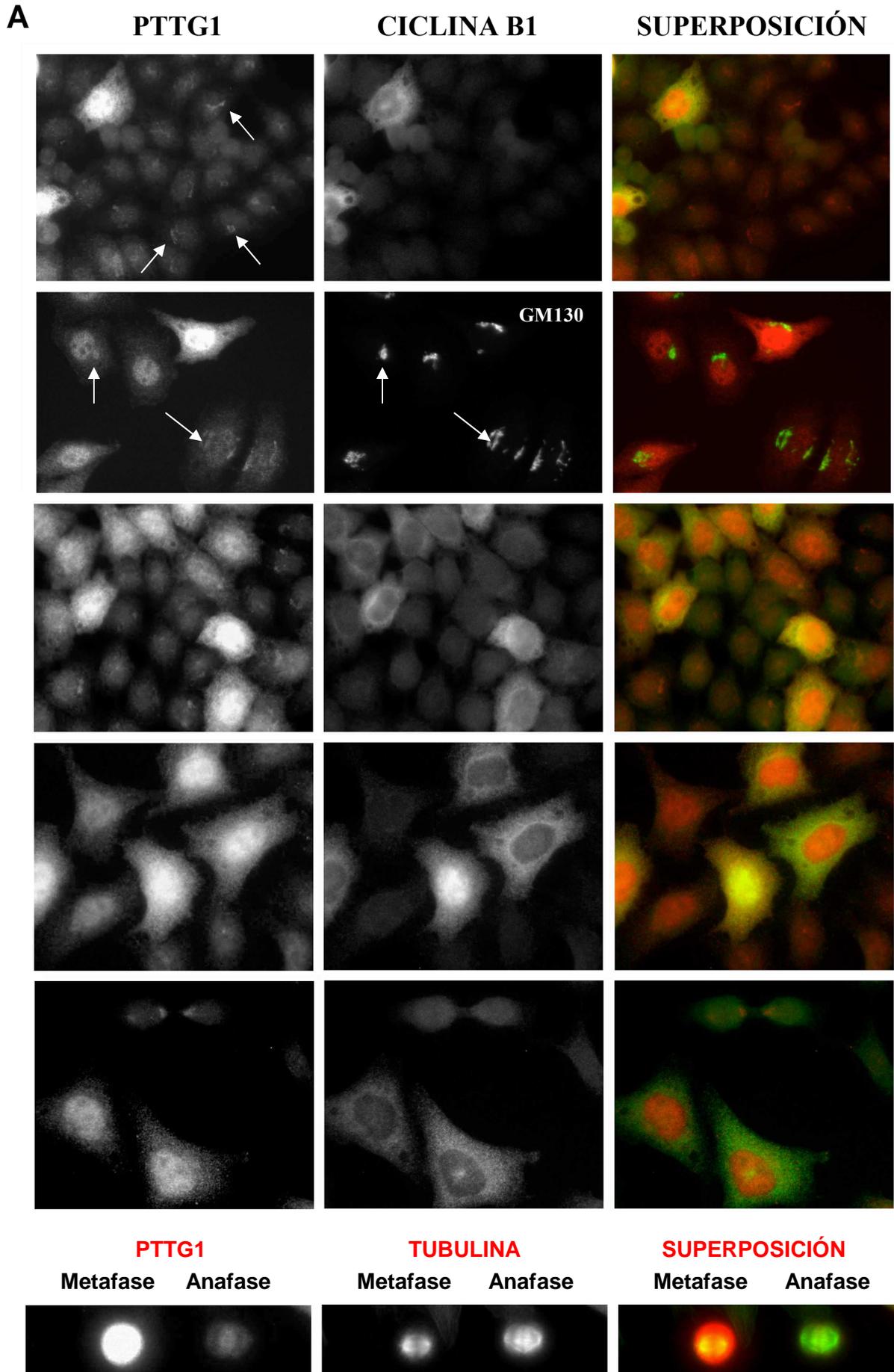


Figura 10. A. *Western blot* empleando el anticuerpo α -PTTG1carb14 sin purificar. Se cargaron extractos solubles (proteína total extraída con detergente NP40) e insolubles (proteína total extraída con Laemli 1X y sonicación) de células HeLa (1 y 2, respectivamente) y HCT116 (3 y 4, respectivamente). Resultados similares se obtuvieron con los anticuerpos α -PTTG1carb16 y α -PTTG1carb18 sin purificar, aunque la señal específica en las mismas condiciones era de menor intensidad. **B.** *Western blot* con los mismos extractos y condiciones que en “A” pero donde se ha empleado el anticuerpo α -PTTG1carb14 purificado por cromatografía de afinidad (elución a pH básico). Con la elución a pH ácido se obtenía el mismo resultado aunque la señal específica era más débil. El carril 5 corresponde a extractos totales de células HeLa incubados con el anticuerpo α -PTTG1carb14 purificado a partir de proteína PTTG1-His transferida a membrana de nitrocelulosa.

2. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA PTTG1 POR INMUNOFLUORESCENCIA EN CULTIVO ASINCRÓNICO

Se realizaron inmunofluorescencias con las líneas celulares HeLa, RPE-1, COS-7, HCT116, U2OS, y A293T utilizando el anticuerpo α -PTTG1carb14 purificado por cromatografía de afinidad, obteniéndose resultados similares. En cultivos asincrónicos se observó un marcaje característico del aparato de Golgi en células en fase G1; el marcador ciclina B1 se utilizó para descartar células que no se encontraran en esta fase del ciclo. En fase S, la proteína se acumulaba tanto en núcleo como en citosol y en fase G2/M los niveles de proteína eran aún mayores en ambos compartimentos. Los niveles más elevados se detectaban en metafase, y el marcaje no estaba asociado a las cromátidas; en anafase la señal descendía bruscamente. En telofase tardía, el marcaje estaba asociado de nuevo al aparato de Golgi.



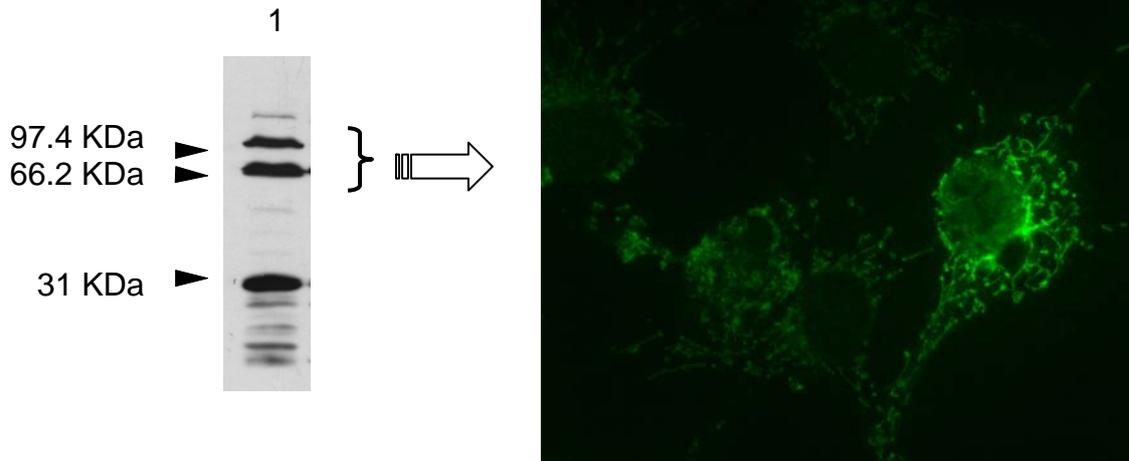
B


Figura 11. A. Inmunofluorescencia de un cultivo asincrónico de células HeLa empleando el anticuerpo anti-PTTG1 purificado. La columna izquierda muestra la señal específica de PTTG1. La fila 1ª muestra una asociación preferente de la proteína con el aparato de Golgi en células negativas para la ciclina B1 (fase G1 del ciclo). La fila 2ª corrobora este resultado mediante el marcador específico de Golgi, GM130 (columna central). La columna central en todos los casos, exceptuando las filas 2ª y 6ª, muestra la inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-ciclina B1 para distinguir la fase del ciclo en la que está cada célula (fase G1: no se detecta ciclina B1, fase S: comienza a acumularse en el citosol, fase G2: aumenta en el citosol, profase: entra al núcleo, donde tiene su pico máximo en metafase y se degrada en anafase al igual que PTTG1). Los niveles de PTTG1 aumentan en núcleo y citosol a medida que avanza el ciclo celular. PTTG1 entra en el núcleo en fase S (filas 3ª, 4ª y 5ª) y se acumula en G2, alcanzando su máximo en metafase (mitosis). En anafase disminuye bruscamente el nivel de proteína (fila 6ª) y en telofase tardía, cuando ya está reconstituido el aparato de Golgi en las células hijas, PTTG1 se encuentra asociado a dichas membranas de Golgi (fila 5ª). PTTG1 cicla de forma similar a la ciclina B1, aunque ésta no se detecta en el núcleo hasta profase temprana (fila 4ª). La fila 6ª muestra el huso mitótico de células en metafase y anafase (anti-Tubulina, columna central). La columna derecha muestra la superposición de los canales rojo (PTTG1) y verde (Ciclina B1, GM130 ó TUBULINA, según los casos). **B. Inmunofluorescencia de células COS-7 empleando el eluido de las bandas de 66 y 98 KDa.** Un extracto proteico soluble (NP40) de células HeLa (1) se resolvió en un gel preparativo de acrilamida y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Ésta se incubó con anti-PTTG1 no purificado durante toda la noche. Tras revelar y detectar las bandas de 98 y 66 KDa, se eluyó el anticuerpo unido a estas bandas mediante una solución de pH ácido. Tras neutralizar y añadir BSA al eluido, se empleó éste para la inmunofluorescencia. El marcaje observado es exclusivamente mitocondrial (corroborado con el marcador *mitotraker*; no mostrado), descartando una posible reacción cruzada del anticuerpo con proteínas de Golgi.

La confirmación del marcaje de Golgi se realizó empleando en las inmunofluorescencias la proteína GM130 como marcador específico de Golgi (**Figura 11A**).

Este mismo patrón de localización se obtuvo utilizando el anticuerpo purificado de membrana de nitrocelulosa (datos no mostrados). Los eluidos de membrana de las bandas superiores de 66 y 98 KDa ensayados en inmunofluorescencia sólo marcaban mitocondrias, por lo que se descartó que dichas proteínas de mayor peso molecular, que aún seguían siendo reconocidas por el anticuerpo purificado aunque de forma muy débil, fuesen proteínas de Golgi (**Figura 11B**).

3. SINCRONIZACIÓN DE LOS CULTIVOS EN FASE G1

Células HeLa se sincronizaron en fase G1 tanto por privación de suero como por liberación desde confluencia (reentrada en el ciclo celular desde G0) (**Figura 12B**). Como era de esperar teniendo en cuenta lo observado en cultivo asincrónico, se observó un débil marcaje nuclear y un destacado marcaje en Golgi (**Figura 12A**).

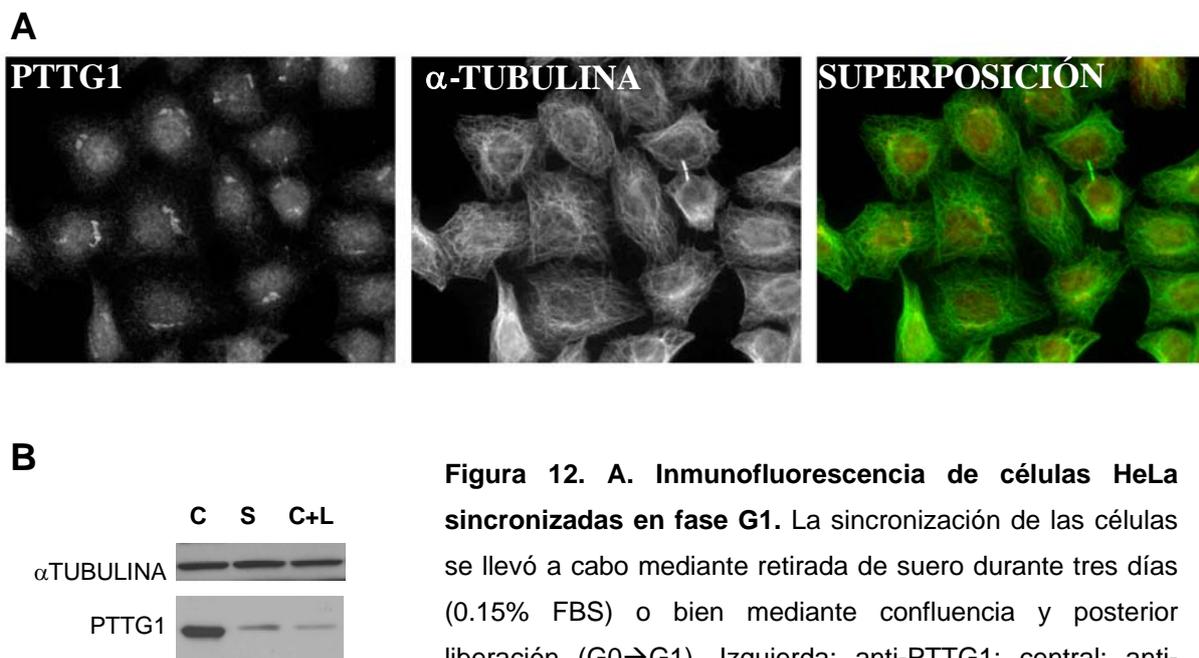


Figura 12. A. Inmunofluorescencia de células HeLa sincronizadas en fase G1. La sincronización de las células se llevó a cabo mediante retirada de suero durante tres días (0.15% FBS) o bien mediante confluencia y posterior liberación (G0→G1). Izquierda: anti-PTTG1; central: anti-

anti-GM130; derecha: superposición de los canales rojo (PTTG1) y verde (GM130). **B. Western blot donde se muestran los niveles de proteína PTTG1 en cultivo asincrónico de células Hela o bien sincronizado en fase G1.** C: Cultivo asincrónico. S: Células cultivadas en 0.15% de suero FBS durante 3 días. C+L: Células llevadas hasta confluencia y posteriormente tripsinizadas, diluidas en medio fresco y cultivadas durante 8 horas (G0→G1).

4. LOCALIZACIÓN DE PTTG1 EN CÉLULAS HUMANAS NO TUMORALES

Como el anticuerpo anti-PTTG1 marcaba el aparato de Golgi en células tumorales, se analizó si dicha localización era dependiente del estado tumoral de la célula o bien era una localización fisiológica. Para ello, se utilizaron células humanas de retina RPE-1, que son células epiteliales inmortalizadas pero no tumorales. Mediante microscopía confocal se confirmó que PTTG1 también se localizaba en Golgi en estas células. PTTG1 colocalizaba parcialmente con la proteína GM130, marcadora del cis-Golgi y de vesículas de la interfase retículo endoplásmico-Golgi (**Figura 13**).

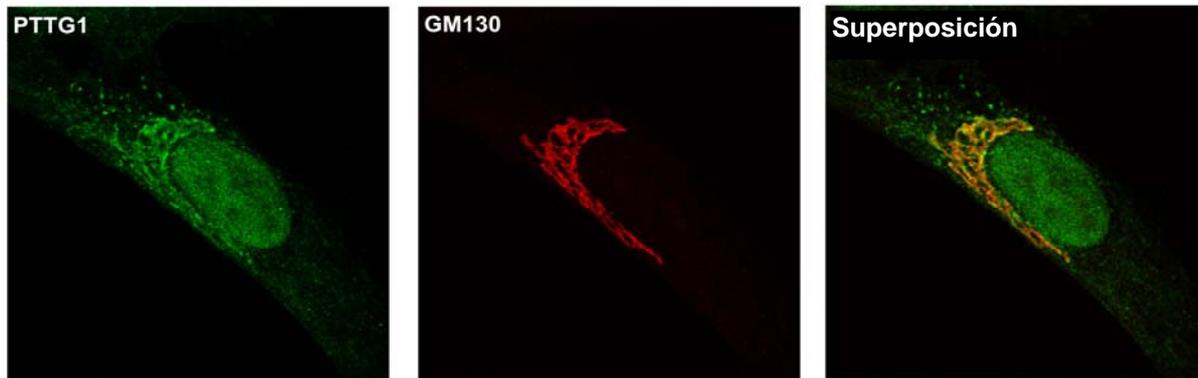


Figura 13. Imagen confocal de una inmunofluorescencia de células RPE-1. Se muestra uno de los planos en Z donde se observa claramente la asociación de PTTG1 (verde) con las membranas del aparato de Golgi (rojo). PTTG1 colocaliza parcialmente con el marcador del cis-Golgi GM130 (Superposición).

5. SUBFRACCIONAMIENTO CELULAR EN CÉLULAS HL60

La localización subcelular de PTTG1 analizada mediante inmunofluorescencia se trató de confirmar analizando las distintas subfracciones celulares. A partir de células humanas promielocíticas HL60 se purificaron distintas fracciones celulares, según se detalla en la sección de Materiales y Métodos, y se estudió por WB la presencia de la proteína PTTG1.

PTTG1 aparecía asociada a la fracción microsomal (Golgi y retículo endoplásmico), además de existir niveles elevados en las fracciones citosólicas y nucleares (**Figura 14**).

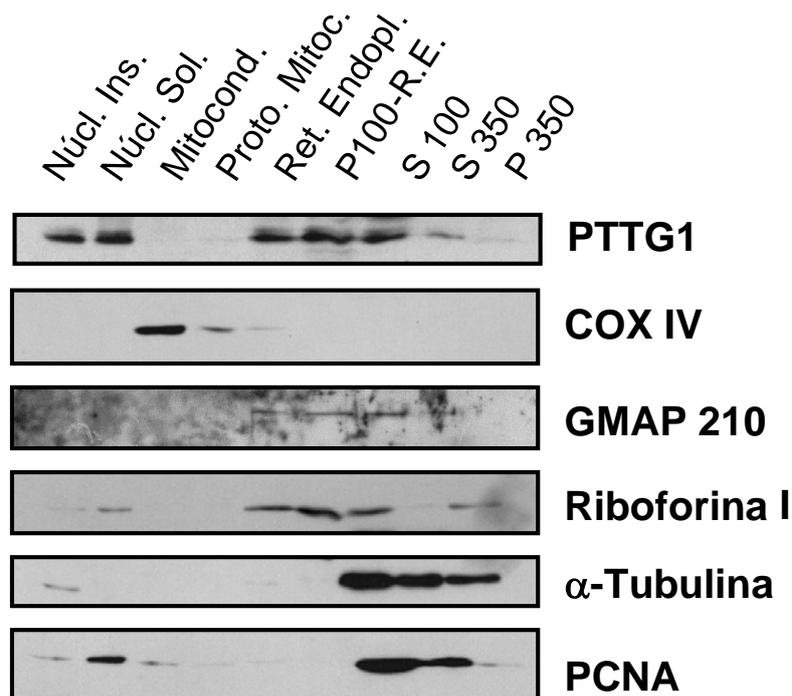


Figura 14. Western blot de fracciones celulares aisladas mediante subfraccionamiento. Se utilizaron los marcadores COX IV para la fracción mitocondrial, GMAP 210 y Riboforina I para la fracción microsómica (Golgi y retículo endoplásmico, respectivamente), α -Tubulina para la fracción soluble, y PCNA para la fracción nuclear y citoplásmica. “Núcl. Sol.” y “Núcl. Insol.” corresponden a los núcleos celulares obtenidos tras centrifugar en el primer paso del subfraccionamiento (Ver *Materiales y Métodos*), extraídos con buffer NP40 (“Núcl. Sol”) o con

Laemli 1X y sonicado ("Núcl. Insol"). "Mitocond." y "Proto. Mitoc." corresponden respectivamente a mitocondrias celulares y protoplastos de mitocondrias, en los que no se detecta proteína PTTG1. "Ret. Endopl." y "P100-RE" corresponden a las fracciones del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, respectivamente. "S100" y "S350" corresponden a las fracciones citosólicas después de ultracentrifugar a 100.000 x g y 350.000 x g, respectivamente. En este último caso, la fracción citosólica se considera pura al estar libre de vesículas de fagocitosis y endocitosis. P350 corresponde al precipitado obtenido tras la ultracentrifugación a 350.000 x g.

6. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA PTTG DE RATÓN. SOBREENPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HUMANA EN UN SISTEMA HETERÓLOGO

Se utilizaron células NIH3T3 de ratón para determinar la localización de la proteína PTTG endógena de estas células. Como muestra la figura 15A izquierda, el anticuerpo generado contra PTTG1 humana reconocía también la proteína de ratón en WB. En la parte central de la figura 15A se muestra la inducción del mensajero Pttg1 humano en células 3T3 transfectadas establemente y de forma inducible con el cDNA Pttg1 humano y en la figura 15A derecha la inducción en células transfectadas con este cDNA mutado en el residuo Serina 165 (Ser→Ala).

Los ensayos de inmunofluorescencia realizados mostraron que la proteína PTTG endógena de células de ratón tiene el mismo patrón de localización que en células humanas, conservando su asociación a las membranas del Golgi (**Figura 15B**). En las células NIH3T3 que expresaban establemente y de forma inducible PTTG1 humana (las mismas líneas empleadas previamente en los ensayos de *Differential Display* y *Arrays de cDNA*), ésta se localiza siguiendo su patrón característico: asociación al Golgi en fase G1; acumulación en núcleo y citosol a medida que avanza el ciclo celular y descenso brusco en anafase (**Figura 15C, panel superior**).

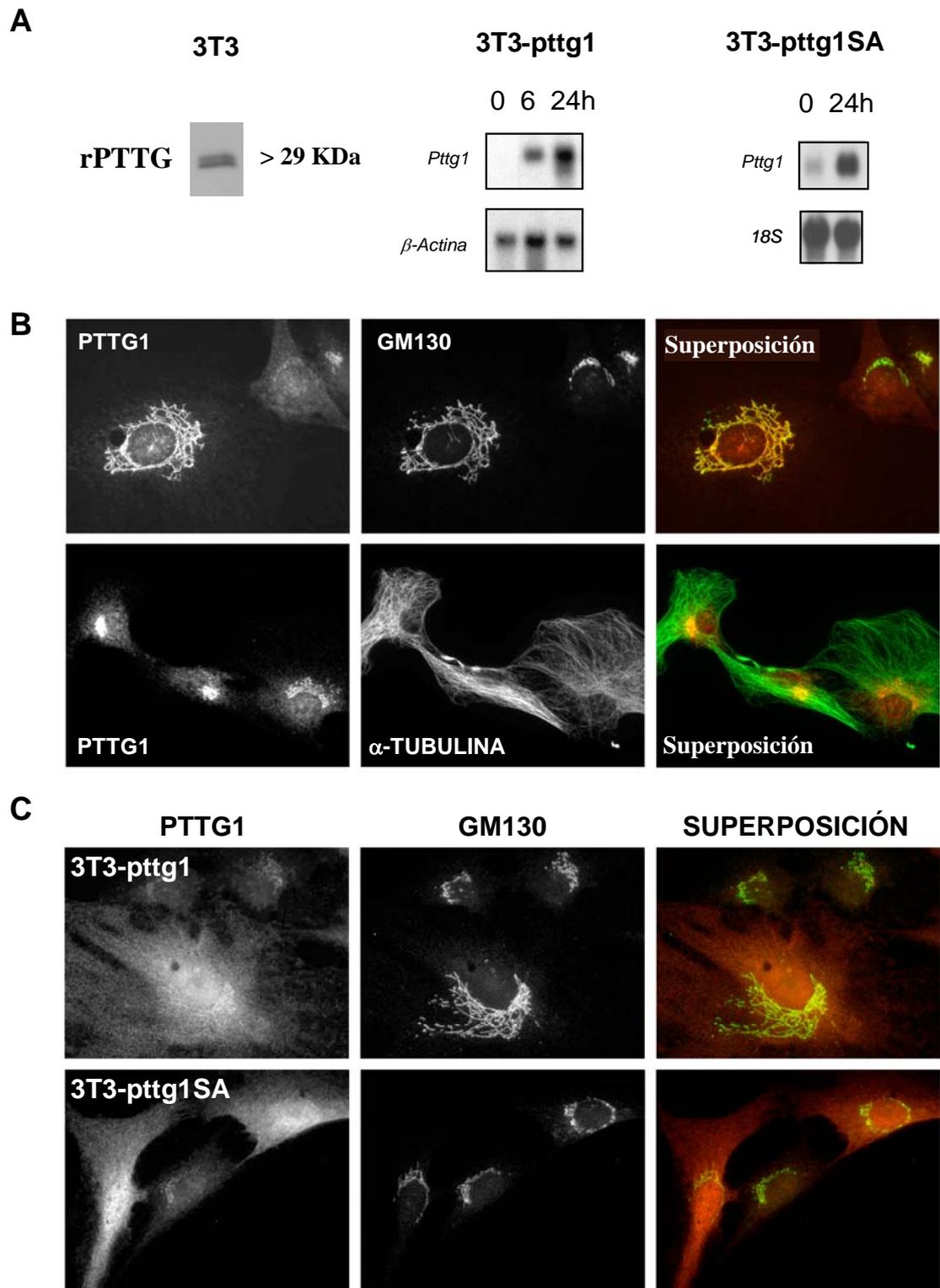


Figura 15. A. Izquierda: *Western* mostrando la banda correspondiente a PTTG endógena de ratón (rPTTG) reconocida por el anticuerpo anti-PTTG1 humana utilizado en las inmunofluorescencias. **Centro y derecha:** *Northern blots* mostrando respectivamente los RNA

mensajeros de PTTG1 y de PTTG1-SA inducidos por IPTG. **B. Proteína endógena.** La fila 1^a muestra la inmunofluorescencia de células NIH3T3 correspondiente a la proteína PTTG de ratón (canal rojo, columna izquierda, anticuerpo anti-PTTG1 humana), al marcador de Golgi GM130 (canal verde, columna central), y a la superposición de ambos canales (columna derecha). En la fila 2^a se muestra el sistema de microtúbulos de la célula (anti-TUBULINA, canal verde). **C. Panel superior “3T3-pttg1”:** células NIH3T3 expresando ectópicamente la proteína PTTG1 humana (sistema inducible por IPTG). La columna izquierda corresponde a la señal de PTTG1 (rojo) obtenida con el anticuerpo específico diluido 5 veces con respecto a “A”, la columna central corresponde al marcador GM130 (verde) y la columna derecha muestra la superposición de ambas señales. **Panel inferior “3T3-pttg1SA”:** células NIH3T3 que expresan ectópicamente la proteína PTTG1 humana mutada en el residuo Ser165. La columna izquierda corresponde a la señal de PTTG1 (rojo) obtenida con el anticuerpo específico diluido 5 veces con respecto a “A”, la columna central corresponde al marcador GM130 (verde) y la columna derecha muestra la superposición de ambas señales. **C. Izquierda:** *Western* mostrando la banda correspondiente a PTTG endógena de ratón (rPTTG) reconocida por el anticuerpo anti-PTTG1 humana utilizado en las inmunofluorescencias. **Centro y derecha:** *Northern blots* mostrando respectivamente los RNA mensajeros de PTTG1 y de PTTG1-SA inducidos por IPTG.

Ya que PTTG1 se fosforila en mitosis por la quinasa Cdk1 en el residuo Serina 165 y que dicha fosforilación parece ser clave para algunas de sus funciones, determinamos la localización de PTTG1 humana mutada en dicho residuo en células NIH3T3. El residuo Serina se sustituyó por un residuo Alanina (**Figura 15C, panel inferior**). Los datos obtenidos en un sistema heterólogo mostraron que la no fosforilación del residuo Ser165 no afectaba aparentemente el patrón de localización de PTTG1 humana.

La proteína PTTG endógena se localiza preferentemente en el aparato de Golgi en células NIH3T3 sin inducir y la proteína ectópica se acumula en citoplasma y núcleo de forma similar a lo observado en células HeLa. La no fosforilación del residuo Ser¹⁶⁵ no parece afectar a la asociación de PTTG1 ectópica a las membranas de Golgi.

7. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA ECTÓPICA PTTG1 FUSIONADA A DIFERENTES EPITOPOS

Se generaron construcciones de PTTG1 fusionada a la proteína GFP (denominadas “PTTG1-GFP” y “GFP-PTTG1” según contuvieran GFP fusionada al extremo carboxilo o al extremo amino, respectivamente) o bien al epítopo c-Myc (“PTTG1-MYC”) en su extremo carboxilo. Se transfectaron células COS-7 y HeLa con dichas construcciones, se analizó su expresión por *western blot* (**Figura 16, A y B**) y se determinó por inmunofluorescencia que la proteína ectópica se acumulaba tanto en núcleo como en citosol, siendo difícil determinar si existía una asociación con las membranas de Golgi (**Figura 16C**).

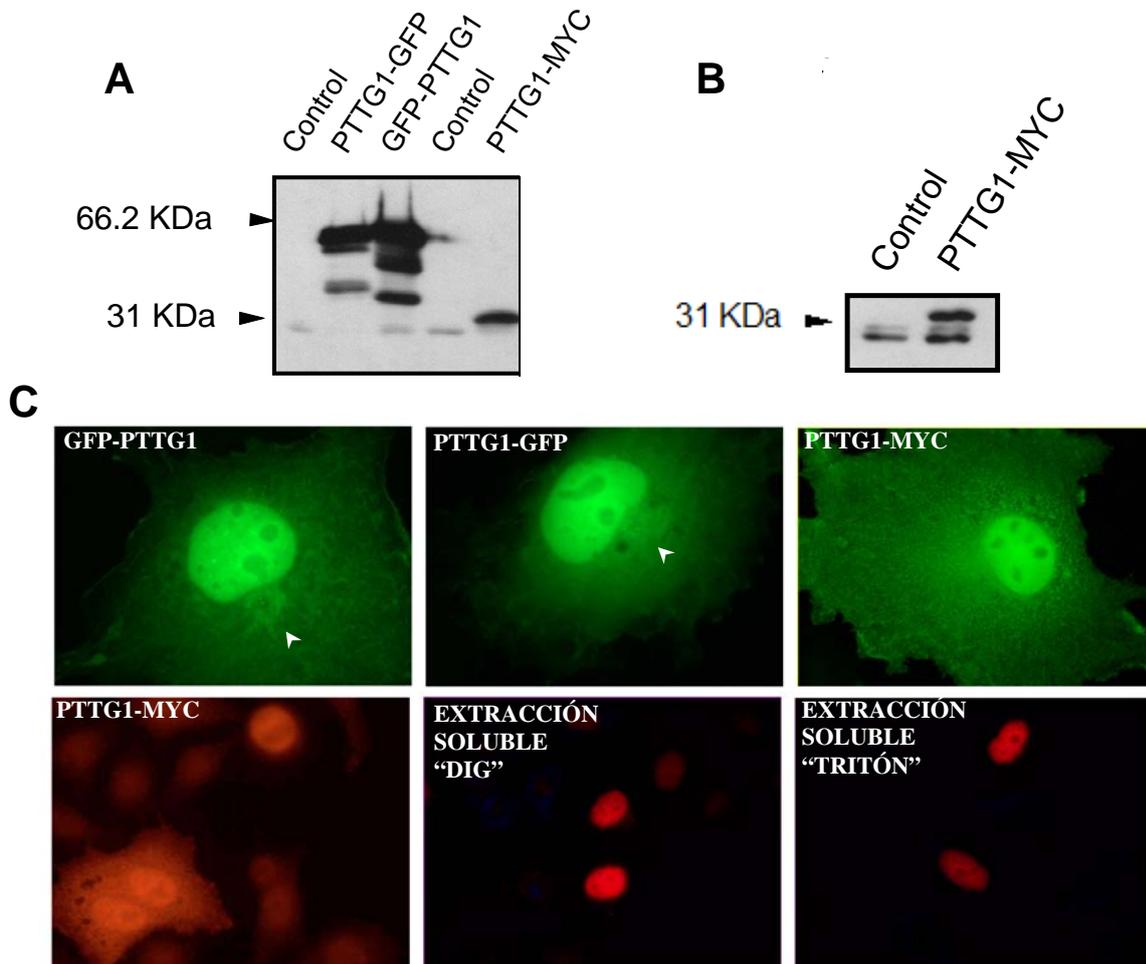


Figura 16. Localización subcelular de PTTG1 ectópica. A y B. Análisis por *western blot* de la expresión de las proteínas de fusión en células COS-7 (A) y HeLa (B), respectivamente. En la

construcción “PTTG1-GFP”, la proteína GFP se fusionó al extremo carboxilo de PTTG1 y en “GFP-PTTG1” se fusionó a su extremo amino. En la construcción PTTG1-MYC, el epitopo MYC se fusionó al extremo carboxilo de PTTG1. **C. Inmunofluorescencias de células expresando las proteínas de fusión.** Las inmunofluorescencias de células COS-7 se muestran en la fila 1. La imagen de la izquierda corresponde a la sobreexpresión de GFP-PTTG1. La imagen central corresponde a la sobreexpresión de PTTG1-GFP. Las flechas señalan la región del centrosoma-Golgi. La imagen de la derecha corresponde a la sobreexpresión de PTTG1-MYC. En la fila 2 se muestran las inmunofluorescencias de células HeLa transfectadas con la proteína PTTG1-MYC. La imagen central muestra la inmunofluorescencia de las mismas células tratadas con el detergente digitonina (50 μ g/ μ l) antes de fijarlas con paraformaldehído, con objeto de extraer la proteína soluble (“EXTRACCIÓN SOLUBLE DIG”). En la imagen de la derecha la proteína soluble de las células se ha extraído con tritón X-100 al 1% (EXTRACCIÓN SOLUBLE TRITÓN”).

Al extraer la proteína soluble con detergentes como digitonina (50 μ g/ml) o tritón X-100 (1%) antes de fijar las células con paraformaldehído, no se detectó generalmente una asociación de la proteína ectópica a las membranas de Golgi (sólo un 4% de las células extraídas con digitonina conservaba el marcaje de Golgi), indicando que la localización en Golgi de PTTG1 probablemente se debiera a una asociación lábil con otras proteínas constituyentes de dichas membranas. La proteína nuclear que permanecía tras el tratamiento con ambos detergentes indicaba una asociación estable de PTTG1 con la matriz insoluble del núcleo (**Figura 16C, fila 2, fotos central y derecha**).

8. DESESTRUCTURACIÓN DEL COMPLEJO DE GOLGI Y EFECTOS SOBRE LA LOCALIZACIÓN DE PTTG1

Células COS-7 transfectadas con la construcción PTTG1-GFP se trataron con la droga nocodazol a una concentración de 10 μ M final durante 2 horas para provocar la desestructuración del complejo de Golgi (el nocodazol desorganiza el sistema de microtúbulos de la célula) y estudiar el efecto sobre la localización de PTTG1. Mediante este tratamiento se observó que la señal de PTTG1 estaba asociada a las vesículas resultantes de la desorganización

del Golgi (**Figura 17A, fila 1**), siguiendo el mismo patrón de localización que el marcador del cis-Golgi GM130 (**Figura 17A, fila 2**). El mismo resultado se obtuvo en células RPE-1 con la proteína PTTG1 endógena (**Figura 17B**).

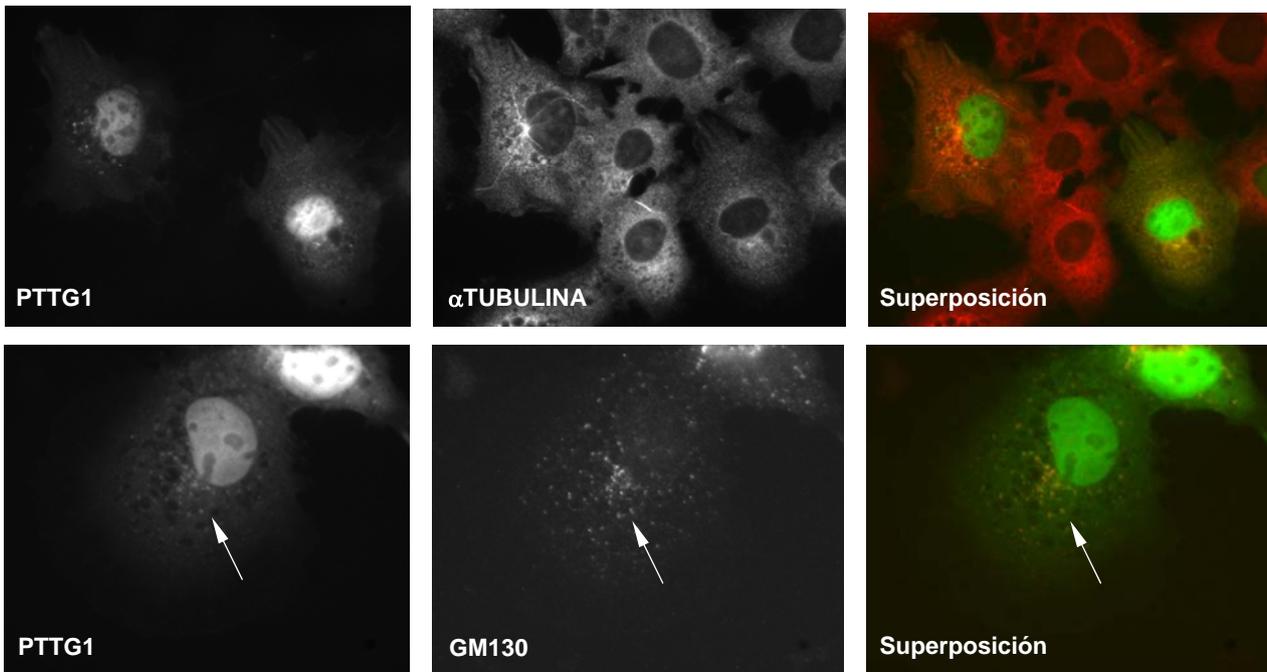
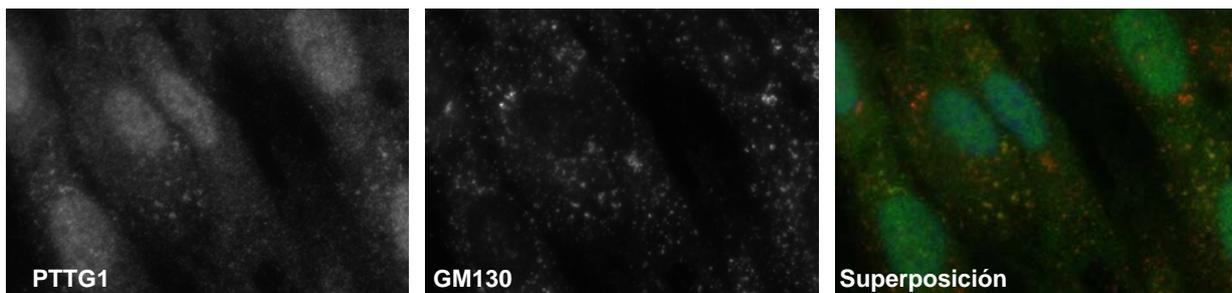
A

B


Figura 17. A. Inmunofluorescencia de células COS-7 transfectadas con PTTG1-GFP y tratadas con nocodazol. La columna izquierda muestra la inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-PTTG1 purificado; la imagen central de la fila 1 muestra la inmunofluorescencia con anti-Tubulina y corrobora la desorganización del sistema de microtúbulos de la célula por nocodazol. La imagen central de la fila 2 muestra la inmunofluorescencia con anti-GM130. La columna derecha muestra la superposición de los canales verde (izquierda) y rojo (central). **B. Células RPE-1 sin transfectar tratadas con nocodazol.**

9. TIME-LAPSE DE CÉLULAS QUE EXPRESAN DE FORMA TRANSITORIA PTTG1-GFP

La asociación a Golgi de PTTG1 se analizó también mediante la técnica de *time lapse in vivo* en células transfectadas previamente con PTTG1 fusionada a GFP. Transcurridas 3 horas después de la transfección se observó que la proteína comenzaba a acumularse en el aparato de Golgi de las células, corroborando los datos obtenidos con el anticuerpo purificado (**Figura 18**).

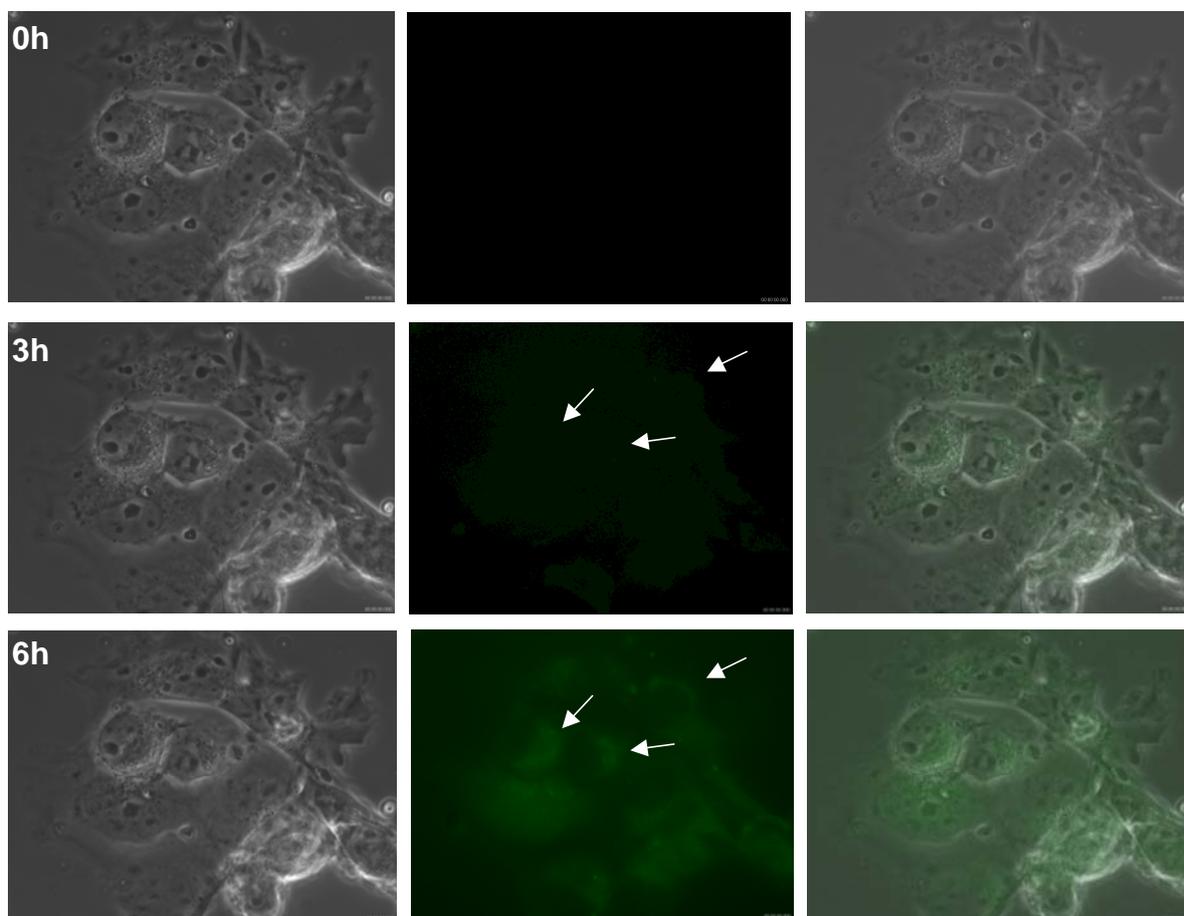


Figura 18. Imágenes de células humanas RPE-1 transfectadas con la construcción PTTG1-GFP. La primera columna muestra el contraste de fases; la segunda columna muestra la fluorescencia de la proteína PTTG1-GFP; la tercera columna corresponde a la superposición de ambas imágenes. La fila primera muestra las fotos tomadas a tiempo 0h. La fila segunda y la fila tercera muestran imágenes después de tres y seis horas, respectivamente, de realizar la transfección. Las flechas señalan la acumulación de la proteína en el aparato de Golgi.

10. INMUNOCITOQUÍMICA DE CÉLULAS RPE-1 EMPLEANDO UN ANTICUERPO MONOCATENARIO FRENTE A PTTG1 OBTENIDO POR LA TÉCNICA DE *PHAGE DISPLAY*

El marcaje del aparato de Golgi observado con el anticuerpo policlonal obtenido frente al fragmento carboxilo de PTTG1 se confirmó de nuevo empleando distintos anticuerpos monocatenarios obtenidos por la técnica del *Phage Display*. De los anticuerpos aislados se escogió el denominado 3F3 que mostraba la mayor afinidad por la proteína PTTG1. Después de inducir las bacterias productoras del anticuerpo 3F3, el sobrenadante se empleó para detectar PTTG1 en células RPE-1 por inmunofluorescencia. Como muestra la figura 19, el anticuerpo monocatenario 3F3 marcaba claramente el aparato de Golgi.

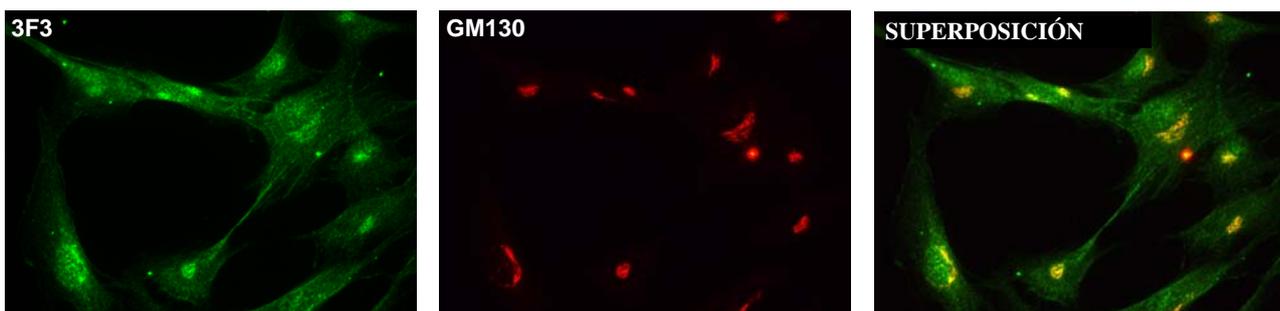


Figura 19. Inmunofluorescencia de células RPE-1. Izquierda y centro: inmunofluorescencia con los anticuerpos 3F3 y GM130, respectivamente. **Derecha:** superposición de los canales verde (PTTG1) y rojo (GM130).

11. SILENCIAMIENTO DE PTTG1 MEDIANTE OLIGOS DE iRNA ESPECÍFICOS

Para confirmar que el marcaje de Golgi observado por inmunofluorescencia era una señal específica debida a la proteína PTTG1, se procedió a silenciar el gen *pttg1* mediante oligonucleótidos específicos de iRNA. La eficacia del oligonucleótido de interferencia diseñado contra Pttg1 se analizó por *western blot* en células HeLa transfectadas con distintas

concentraciones del iRNA (**Figura 20A**). Ya que los niveles de proteína PTTG1 descendían dramáticamente empleando 120 nM de oligonucleótido, se escogió esta concentración para realizar los ensayos de inmunofluorescencia. En ellos se observó que desaparecía completamente el marcaje asociado al citosol, pero permanecía una señal intensa asociada al aparato de Golgi y al núcleo (**Figura 20B**). El mismo resultado se obtuvo con diferentes oligonucleótidos de iRNA-PTTG1, incluso tras 96 horas de tratamiento con los mismos.

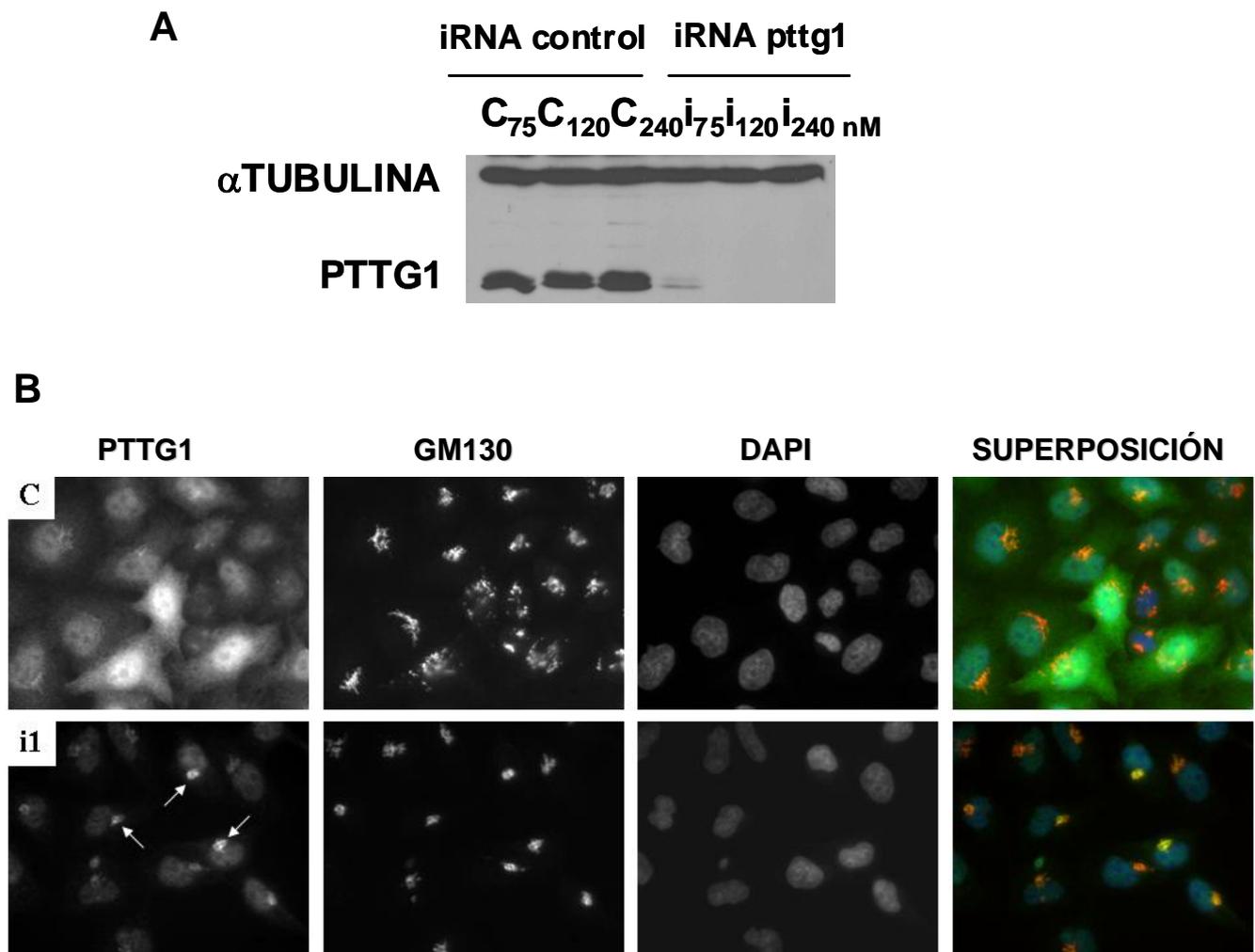


Figura 20. Silenciamiento de PTTG1 mediante oligonucleótido específico de iRNA. A. *Western blot* mostrando la bajada de PTTG1 a distintas concentraciones de oligonucleótido de interferencia. Los carriles C₇₅, C₁₂₀ y C₂₄₀ corresponden a extractos de células HeLa que han sido interferidas durante 48 h con un oligonucleótido aleatorio a las concentraciones indicadas. Los carriles I₇₅, I₁₂₀ e I₂₄₀, corresponden a extractos de la misma línea celular que ha sido

transfectada con un oligonucleótido de interferencia específico contra PTTG1, a las mismas concentraciones. **B.** Inmunocitoquímica de las mismas células tras 48 horas de transfección. Se muestra el marcaje con el anticuerpo purificado frente a PTTG1 (canal verde), con el marcador de Golgi GM130 (canal rojo) y con el marcador nuclear DAPI (canal azul). El panel superior "C" corresponde a la interferencia realizada con un oligo aleatorio a 120 nM final y el panel inferior "i1" corresponde a la realizada con el oligo específico frente a PTTG1, también a 120 nM final.

12. SILENCIAMIENTO DE PTTG1 MEDIANTE iRNAs ESPECÍFICOS EXPRESADOS ESTABLEMENTE POR LENTIVIRUS

La detección en el aparato de Golgi de PTTG1 tras la interferencia podría deberse a la estabilidad diferencial de la proteína en los distintos compartimentos celulares, ya que en células RPE-1 la inhibición de la síntesis de proteínas mediante tratamiento con cicloheximida (CHX) a distintos tiempos (3, 12 y 24 horas) muestra que la proteína menos estable es la citosólica pues desaparece a las 3 horas del tratamiento (**Figura 21B**). Sin embargo, la proteína localizada en núcleo y Golgi permanece incluso tras 24 horas de tratamiento (**Figura 21C**).

Por ello, se utilizó otra estrategia para silenciar PTTG1 de forma continuada y durante tiempos más largos. Se generaron lentivirus que expresaban un iRNA frente a PTTG1 de forma estable (lentivirus-iPTTG1) una vez integrados en el genoma de las células. Se infectaron células RPE-1 con una MOI de 0.5.

Tras cuatro rondas de subcultivo, el marcaje nuclear y de Golgi en estas células infectadas era aún significativo (**Figura 21D, E y F**), a pesar de observarse niveles mínimos de proteína PTTG1 por *western blot* (**Figura 21G**).

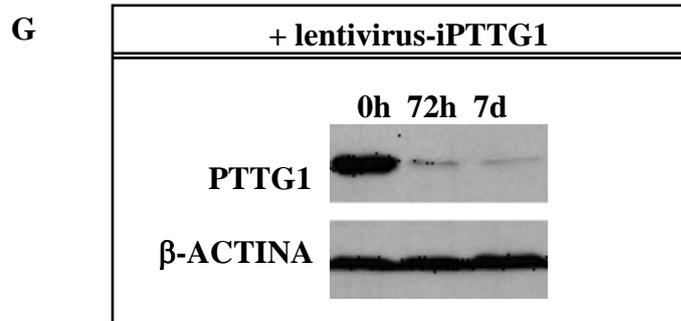
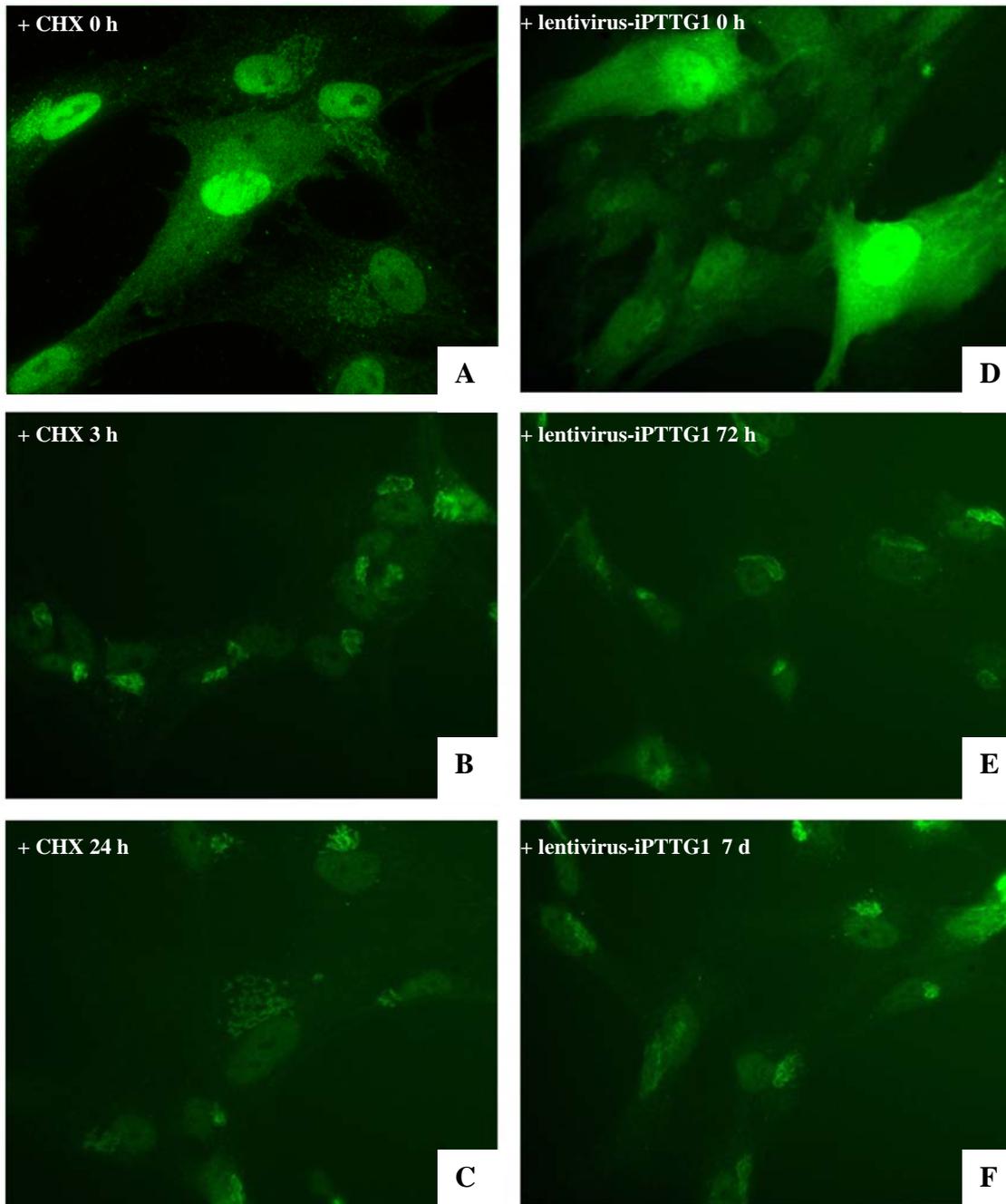


Figura 21. A, B y C. Inmunofluorescencia de células RPE-1 tratadas con cicloheximida para inhibir la síntesis de proteínas. Se muestran las células control a 0 horas (A), y las tratadas durante 3 (B) y 24 horas (C). La proteína PTTG1 citosólica soluble desaparece tras 3 horas de tratamiento. Sin embargo, a tiempos más largos, la proteína nuclear y la asociada al aparato de Golgi no desaparecen. **D, E y F. Inmunofluorescencia de células RPE-1 infectadas establemente con lentivirus-iPTTG1.** Se muestra el marcaje con anti-PTTG1 tras 0 h (D), 72 h (E) y 7 días (F) de la infección vírica. El anticuerpo secundario anti-conejo se utilizó conjugado al fluorocromo Texas Red. Todas las fotos se tomaron en blanco y negro y se montaron las imágenes en el canal verde mediante el programa Adobe Photoshop. **G. Western blot que muestra a distintos tiempos la eficiencia de la interferencia en células infectadas con lentivirus-iPTTG1.**

Este resultado sugería que la proteína localizada en el aparato de Golgi debía de ser muy estable, pues no disminuía su nivel tras varias rondas de subcultivo (unas dos semanas desde la infección vírica). Para confirmar este hecho, se mantuvo el cultivo infectado durante otras 2-3 semanas y se analizó por inmunofluorescencia y *western blot*. Se observó que las células infectadas mostraban niveles parecidos a los de las células silvestres (**Figura 22 A y B**), sugiriendo este resultado que algunas de las células no infectadas, probablemente más viables, llegaron a constituir al cabo de varias rondas de subcultivo una proporción notable de la población celular, como refleja el *western blot*.

Por tanto, se puede concluir que la proteína localizada en Golgi o bien es más estable que la localizada en el citosol, o bien dicha proteína tras varias rondas de subcultivo corresponde a alguna de las isoformas de PTTG1 presentes en la célula, y que no se interfirieron con lentivirus-iRNAs específicos de PTTG1.

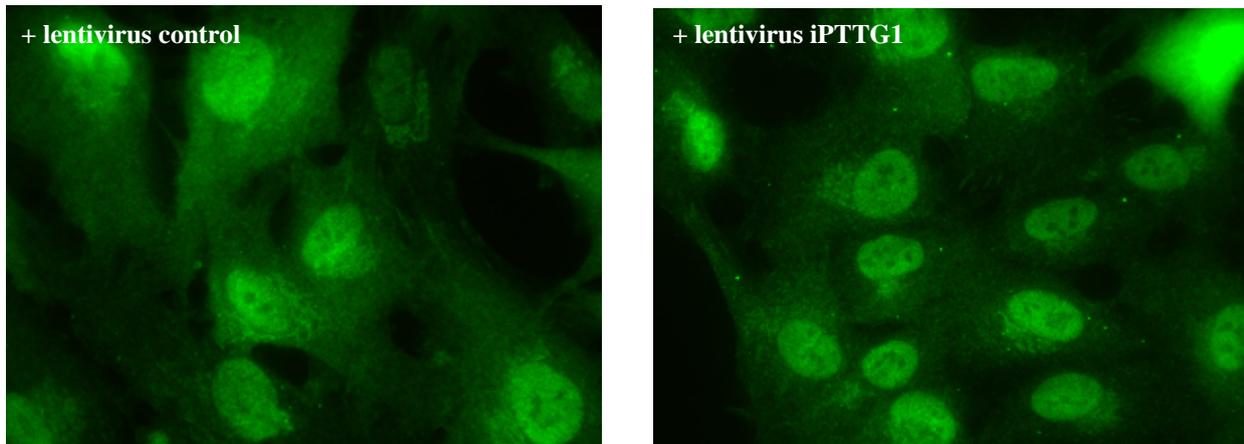
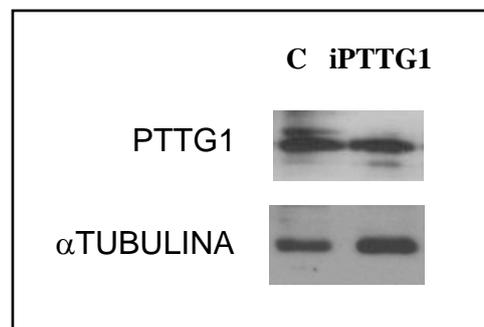
A

B


Figura 22. A. Inmunofluorescencia de células RPE-1 infectadas con lentivirus control o bien con lentivirus iPTTG1 tras varias rondas de subcultivo. La inmunofluorescencia muestra que el cultivo interferido se asemeja al cultivo control (verde: anti-PTTG1). B. *Western blot* que muestra los niveles de PTTG1 del cultivo anterior. "C": cultivo infectado con lentivirus-control; iPTTG1: cultivo infectado con lentivirus-iPTTG1. α -Tubulina se emplea para normalizar la cantidad de proteína.

CAPÍTULO 3º

“CARACTERIZACIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS ISOFORMAS PTTG2 Y PTTG3. EFECTOS DE SU SILENCIAMIENTO EN LA CÉLULA”

1. INTERFERENCIA CONJUNTA DE LOS GENES *pttg1*, *pttg2* Y *pttg3*. ESTUDIO DEL MARCAJE DE GOLGI Y EFECTOS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

Ya que la interferencia de PTTG1 no hacía desaparecer el marcaje nuclear y de Golgi observado en las inmunofluorescencias, se diseñó un oligo de interferencia frente a los tres genes homólogos *pttg1*, *pttg2* y *pttg3*.

Se utilizó dicho oligo (i1,2,3) para interferir células HeLa y se observó que el marcaje de Golgi desaparecía tras 72 horas de tratamiento. El marcaje citosólico y nuclear desaparecía en su mayoría, aunque se detectaba un fondo nuclear marcado (**Figura 23A**). El RNA de interferencia frente a las tres formas de securina afectaba notablemente a la viabilidad del cultivo, ya que su número de células a las 72 horas era muy inferior a las del cultivo transfectado con un oligo control, observándose además una tasa elevada de muerte celular.

Se llevó a cabo una cinética de crecimiento del cultivo a las 24, 48 y 72 horas de la transfección con el oligo i1,2,3 versus un oligo aleatorio control (C) (**Figura 23B**). Se observó entre los cultivos una diferencia en el número de células desde las 24 horas, y esta diferencia aumentaba con el tiempo. La eficiencia de interferencia del oligo i1,2,3 se determinó analizando los niveles de PTTG1 por *western blot*, ya que no se disponía de anticuerpos frente a PTTG2 y PTTG3 (**Figura 23C**).

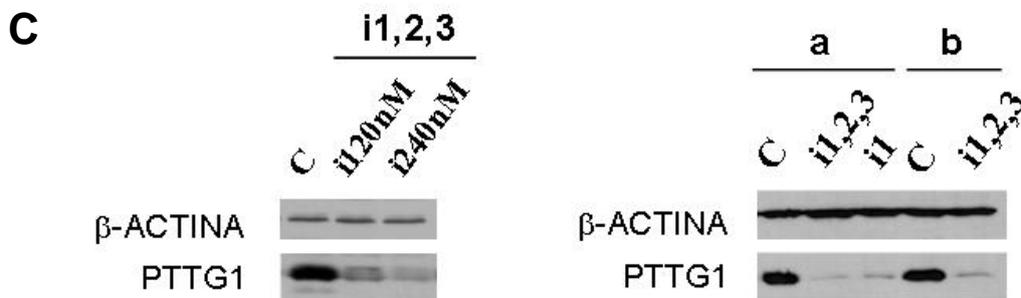
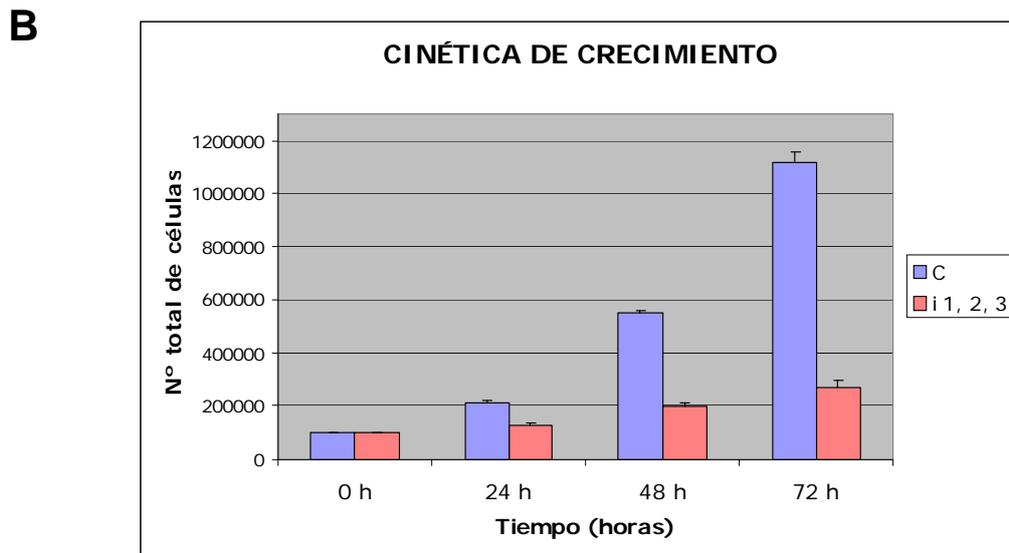
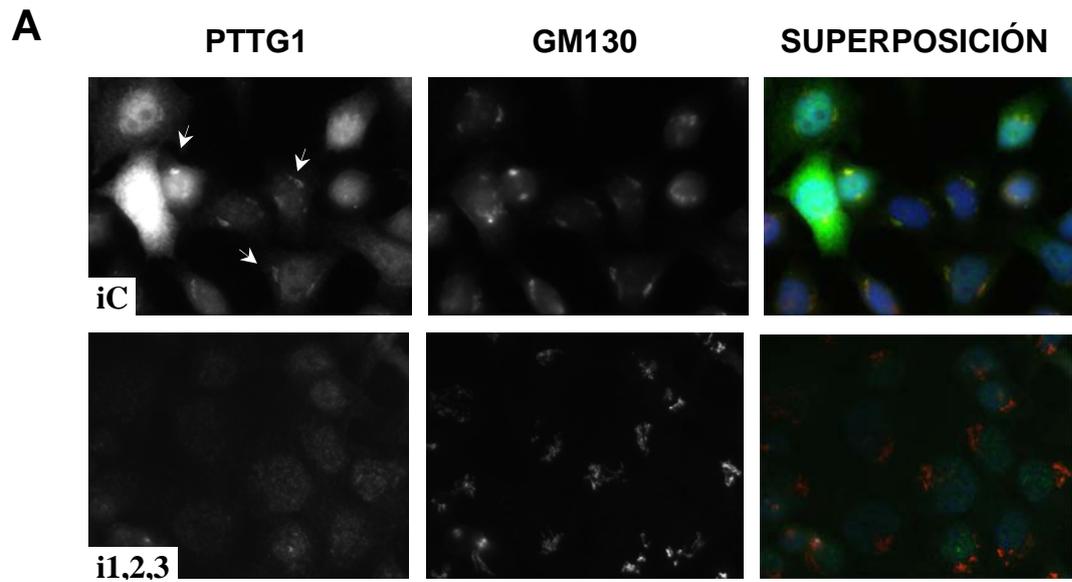


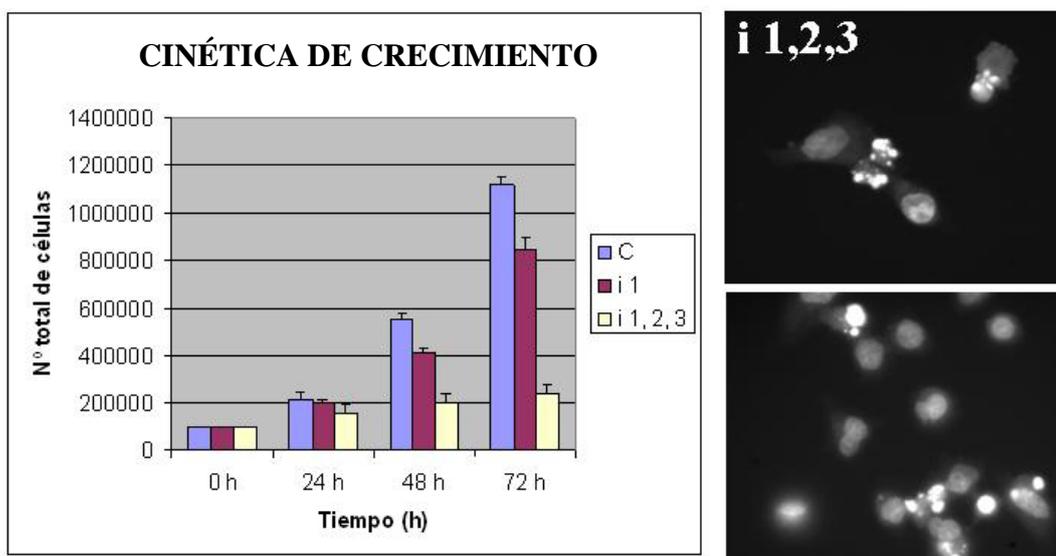
Figura 23. A. Inmunofluorescencia de células HeLa interferidas con un iRNA aleatorio control (iC) o bien con un iRNA para *pttg1*, *pttg2* y *pttg3* (i1,2,3). La primera columna muestra el marcaje con anti-PTTG1 (verde); la segunda columna muestra el marcador de Golgi

GM130 (rojo); la tercera columna muestra la superposición de los dos canales (se ha sumado el canal azul –DAPI– para visualizar con claridad los núcleos celulares). El marcaje de Golgi desaparece cuando se interfieren los tres genes *pttg1*, *pttg2* y *pttg3* conjuntamente (i1,2,3). **B. Curva de crecimiento de los cultivos interferidos con i control (C) y con i1,2,3. C. Western blots.** El de la izquierda muestra los niveles de PTTG1 al interferir con distintas concentraciones del oligo i1,2,3. En el de la derecha se muestran los niveles de PTTG1 en células transfectadas con el oligo i1,2,3 y con el oligo i1 a las concentraciones utilizadas en experimentos anteriores. Los experimentos “a” y “b” son independientes y en ellos se ha estudiado en paralelo la cinética de crecimiento y la desaparición del marcaje de Golgi. La concentración de oligo fue de 240 nM y los extractos de proteínas se obtuvieron a las 48 horas de tratamiento.

2. SILENCIAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS PTTG2 Y PTTG3 VERSUS PTTG1. EFECTOS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR E IMPLICACIÓN DE P53

La interferencia de PTTG1 afectaba sólo moderadamente al crecimiento de las células, aumentando discretamente la fase G1 del ciclo y no se observaba muerte celular (**Figura 24A y B**). Sin embargo, la interferencia conjunta de las tres proteínas PTTG1, PTTG2 y PTTG3 generaba en torno al 30-35% de células muertas (**Figura 25C**). De ese porcentaje, al menos el 18% correspondía a células apoptóticas, como indicaba el porcentaje subG1 de la citometría (**Figura 24B**). La tinción con DAPI de núcleos celulares de cuatro transfecciones independientes revelaba la presencia de núcleos apoptóticos (**Figura 24A**).

Como muestra la figura 24B, el porcentaje de células en subG1 aumentaba bruscamente cuando se interfería con el oligo i1,2,3 a 240 nM (asterisco), acorde con lo observado en la figura 24A, donde los campos representados corresponden a cultivos interferidos en esas condiciones. Al suprimir la expresión de los tres genes homólogos se observaba por citometría un aumento de la fase S (círculo) y un menor porcentaje de células en fase G1 y G2, sugiriendo este resultado un bloqueo del ciclo celular en fase S.

A

B

| | | % Sub G1 | % G1 | % S | % G2 |
|----------|---------------------------------|----------|-------|-------|-------|
| 1 | Control + medio optimen | 4.1 | 58.14 | 23.61 | 14.15 |
| 2 | Control + oligofectamina | 2.4 | 63.82 | 19.96 | 16.22 |
| 3 | iRNA aleatorio 240 nM | 3.0 | 64.10 | 24.40 | 11.5 |
| 4 | iRNA pttg1,2,3 240nM | 18 * | 39.19 | 37 | 5.7 |
| 5 | iRNA pttg1 240nM | 4.8 | 68.46 | 16.77 | 14.77 |
| 6 | iRNA pttg1,2,3 50nM | 6.5 | 51.4 | 34.3 | 7.71 |

Figura 24. A Cinética de crecimiento de los cultivos interferidos e imágenes de núcleos apoptóticos con i1,2,3. La gráfica muestra la cinética de crecimiento de cultivos interferidos con un oligo control de secuencia aleatoria (c), con el oligo i1, y con el oligo i1,2,3. Las imágenes de la derecha muestran los núcleos marcados con DAPI del cultivo interferido con el oligo i1,2,3 al cabo de las 72 horas de tratamiento **B. Porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo (incluyendo subG1) de los cultivos interferidos durante 72 horas.** En “1” y “2” se muestran los porcentajes de los cultivos crecidos en el medio de interferencia (Optimen) y en el medio de interferencia con el reactivo de transfección (Optimen +

oligofectamina), respectivamente. En “3” se muestran los porcentajes del cultivo interferido con un oligo aleatorio a la misma concentración que los demás oligos empleados (240 nM). En “4” se muestran los datos de la interferencia con el oligo i1,2,3 y en “5” los de la interferencia con el oligo i1. En “6” se indican los porcentajes obtenidos al interferir con el oligo i1,2,3 a una concentración de 50 nM. Todos los porcentajes mostrados representan la media de tres experimentos independientes.

Para discernir si el efecto de muerte celular observado se debía a la falta de PTTG2 y PTTG3 en la célula, ya que no era debido a la ausencia de PTTG1, se diseñó un iRNA de interferencia específico contra ambas proteínas PTTG2 y 3 (i2,3) conjuntamente (**Figura 25A**), y dos iRNAs específicos contra PTTG2 (i2) y PTTG3 (i3) respectivamente, que no afectaban significativamente a los niveles de PTTG1 (**Figura 25B**).

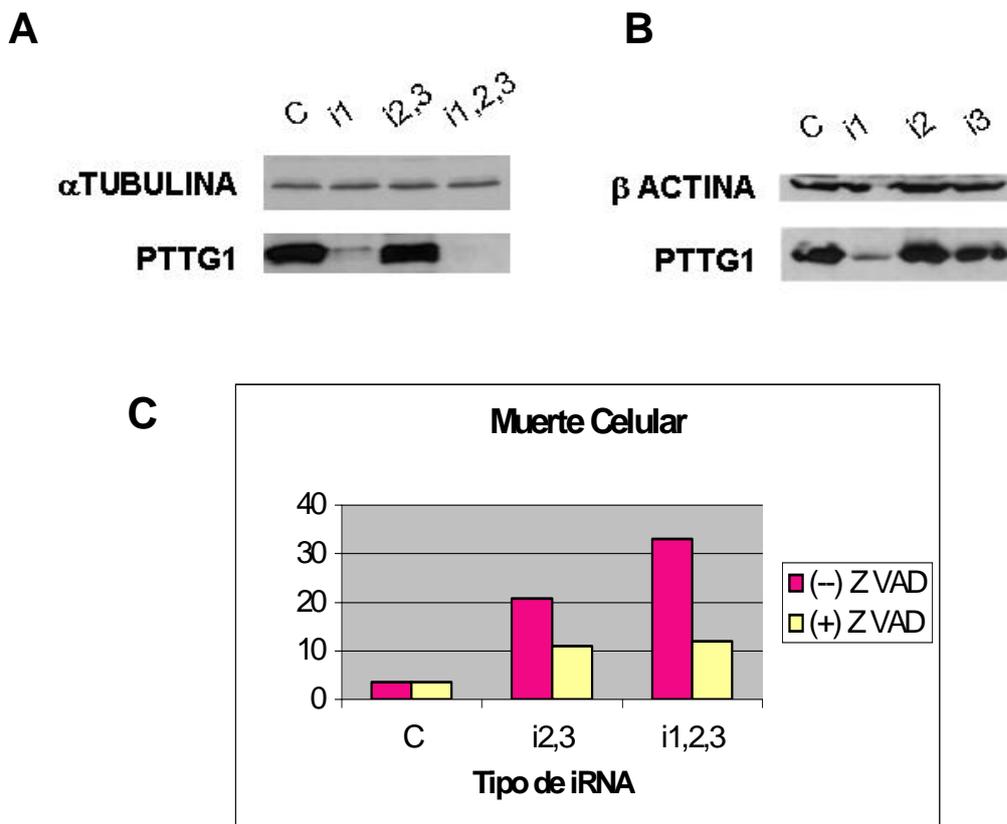


Figura 25. *Western blots* que muestran la especificidad de los oligos de interferencia empleados contra los genes *pttg2* y *pttg3*. A. c: cultivo control; i1: iRNA específico para

pttg1; i2,3: iRNA que interfiere tanto *pttg2* como *pttg3*; i1,2,3: iRNA que interfiere los tres genes homólogos *pttg1*, *pttg2* y *pttg3*. **B.** c: cultivo control; i1: iRNA específico para *pttg1*; i2: iRNA específico para *pttg2*; i3: iRNA específico para *pttg3*. La concentración final de oligo fue de 240 nM y las células se recogieron 72 horas después de transfectar con los oligos de interferencia. **C. Gráfica donde se muestran los porcentajes de muerte celular de los cultivos interferidos con i2,3 y con i1,2,3 tras 72 horas de tratamiento.** En amarillo se representan los resultados al incluir en el medio de cultivo el inhibidor general de apoptosis Z-VAD. Los porcentajes mostrados son la media de tres experimentos independientes.

El porcentaje de muerte celular observado con el oligo i1,2,3 (240 nM) era del 30-35% tras 72 horas de tratamiento, mientras que con el oligo i2,3 a la misma concentración era del 20-25% (**Figura 25C**). La muerte celular era mayormente apoptótica ya que disminuía notablemente al añadir al medio de cultivo el inhibidor general de apoptosis Z-VAD (**Figura 25C**).

Para estudiar en detalle la viabilidad de los cultivos interferidos con cada uno de los iRNAs utilizados, se determinó el número total de células (discriminando las células muertas con azul de tripano) transcurridas 72 horas tras interferir con cada uno de los iRNAs (i1, i2, i3, i2,3 ó i1,2,3) y un iRNA aleatorio control. Se determinó que los efectos drásticos sobre la viabilidad del cultivo se debían al silenciamiento de Pttg2 y Pttg3 (y no Pttg1), siendo mayor el efecto del iRNA contra Pttg2 (**Figura 26**).

La disminución del número total de células de los cultivos interferidos podría deberse a una combinación del bloqueo del ciclo celular en fase S junto con la elevada muerte celular observada. Teniendo en cuenta el importante papel que juega la proteína p53 en los mecanismos de parada de ciclo celular y apoptóticos, se determinó su posible implicación en los efectos observados tras la interferencia de *pttg1*, *pttg2* y *pttg3*, máxime al haber demostrado nuestro grupo de investigación la interacción de PTTG1 y p53, y la modulación mediante esta interacción de la funcionalidad de p53.

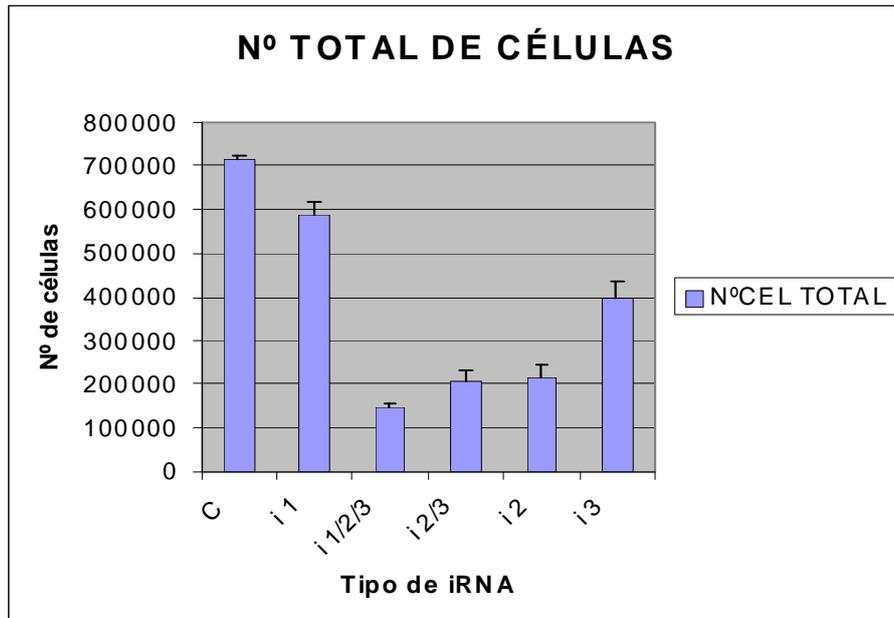


Figura 26. Viabilidad de las células control (c) e interferidas con i1, i2, i2,3 e i1,2,3.

Se determinó por *western blot* si la interferencia con los iRNAs *pttg2* y *pttg3* afectaba los niveles de p53. Se observó que los niveles de p53 en las células interferidas con i2,3 eran más altos que en las células interferidas con i1 o con un iRNA aleatorio control (iC) (**Figura 27A**). Este resultado sugiere la implicación de p53 en los efectos desencadenados por la supresión de los genes homólogos de Pttg1.

Ya que el silenciamiento de PTTG2 y PTTG3 (y no PTTG1) traía consigo una parada relativa en fase S (**Figura 24B**), se realizaron los experimentos de interferencia sincronizando previamente las células en la transición G1/S mediante doble tratamiento con timidina. En estas nuevas condiciones, se observó que la muerte celular aumentaba significativamente, siendo mayor el porcentaje de muerte cuando se suprimía la expresión de *pttg2*, con respecto a *pttg3* ó *pttg1* (**Figura 27C**). Este resultado sugería que el bloqueo del ciclo en fase S y la muerte celular observada eran procesos que estaban ligados y en los que Pttg2 tendría un papel preponderante.

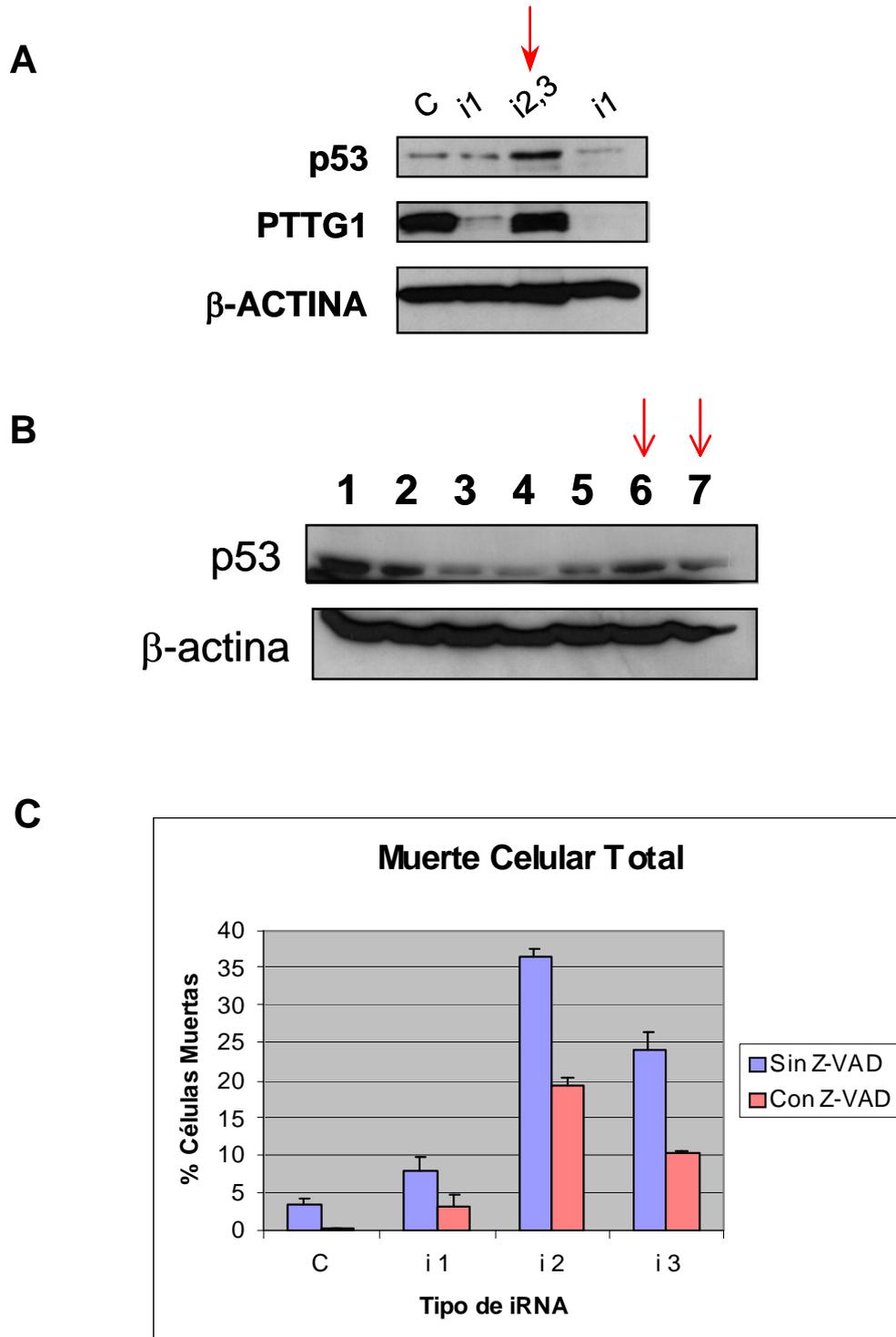


Figura 27. A y B. Western blots que muestran la inducción del gen supresor tumoral p53 en cultivos interferidos con i2,3. A. C: cultivo control; i1: cultivo interferido con i1 a 150 nM (2^o carril) ó 240 nM (4^o carril); i2,3: cultivo interferido con i2,3 a 240 nM; **B. 1:** cultivo tratado con la droga doxorrubicina (0,2 µg/ ml) para inducir p53 (control positivo); 2: cultivo tratado con la droga camptotecina (0,3 mM) para inducir p53 (control positivo); 3: cultivo control sin

tratamiento; 4: cultivo control con el reactivo de transfección a las mismas concentraciones que las empleadas en la interferencia conjunta de PTTG2 y PTTG3; 5: cultivo control donde se ha añadido al medio el inhibidor de apoptosis Z-VAD a la misma concentración que la empleada en 7; 6: cultivo interferido con el oligo específico frente a PTTG2 y 3, i2,3 (240 nM), sin Z-VAD; 7: cultivo interferido con i2,3 (240 nM) en presencia del inhibidor general de apoptosis Z-VAD.

C. Gráfica donde se muestran los porcentajes de muerte celular de los cultivos interferidos con i1, i2 ó i3, tras 72 horas de tratamiento. Los cultivos fueron sincronizados en la transición G1/S mediante adición de timidina (doble bloqueo) al medio de cultivo. Se muestran en color rosa los porcentajes de muerte celular de células transfectadas con oligos de interferencia y cultivadas en presencia del inhibidor general de apoptosis Z-VAD.

3. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS PTTG2 Y PTTG3 EN BACTERIAS Y OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS

Para confirmar los resultados anteriores y demostrar que la muerte celular en cultivo y la parada en fase S eran debidas a la bajada de los niveles de las proteínas PTTG2 y PTTG3 tras la interferencia con los iRNAs, se generaron anticuerpos específicos contra las proteínas PTTG2 y PTTG3.

3.1. Caracterización y localización subcelular de PTTG2

Se obtuvieron en conejo diferentes anticuerpos contra la proteína completa PTTG2 y contra el péptido carboxilo terminal específico de dicha proteína, para evitar posibles reacciones cruzadas. Los anticuerpos obtenidos se purificaron por cromatografía de afinidad bien en columna o bien en membrana de nitrocelulosa y fueron ensayados frente a diferentes extractos celulares, una vez comprobado que reconocían en WB la proteína recombinante PTTG2-His.

Los WB de extractos celulares mostraban numerosas bandas inespecíficas. Sin embargo, mediante distintas condiciones de bloqueo e incubación con el anticuerpo primario obtenido frente al péptido carboxilo terminal, así como con el anticuerpo secundario, se obtuvo una banda específica de 28 kDa de peso molecular (**Figura 28A, primer carril**).

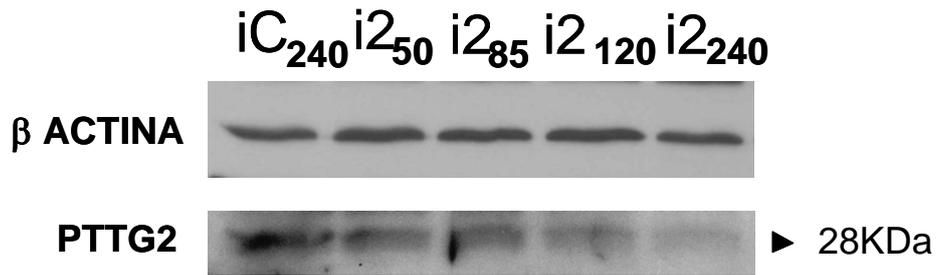
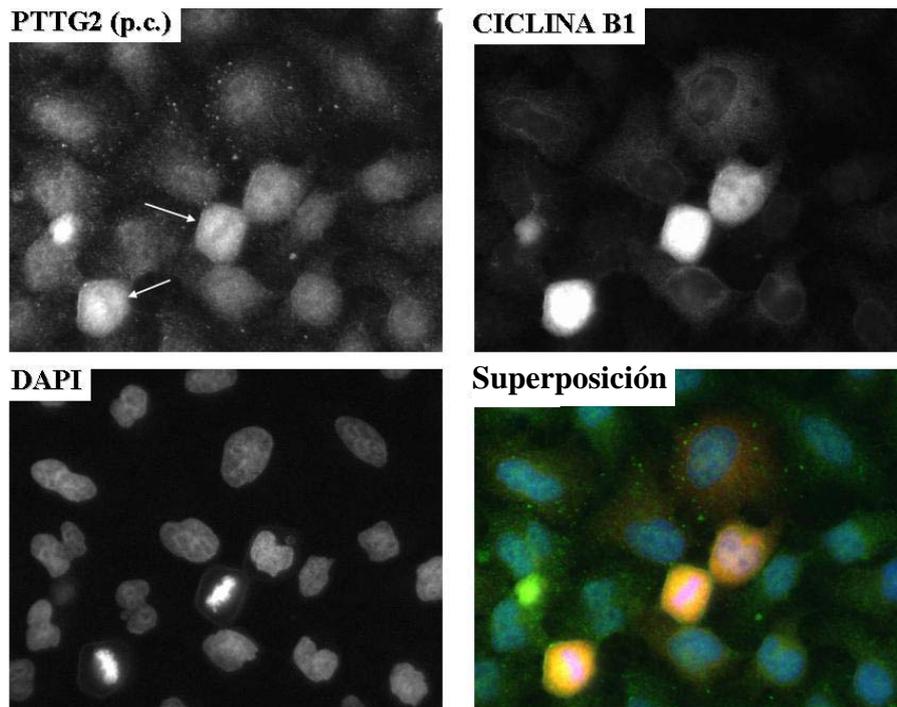
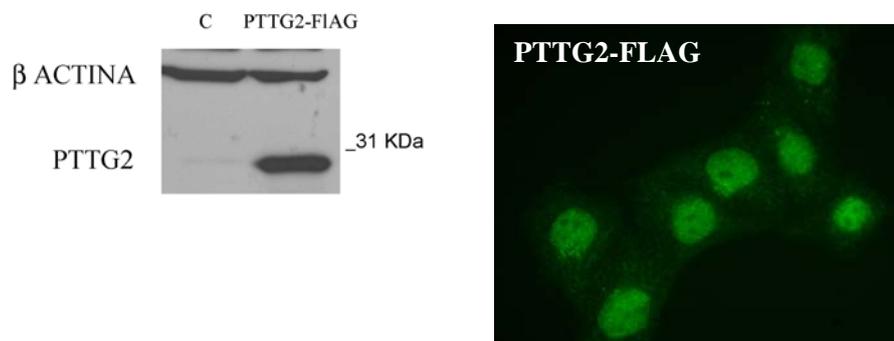
A

B

C


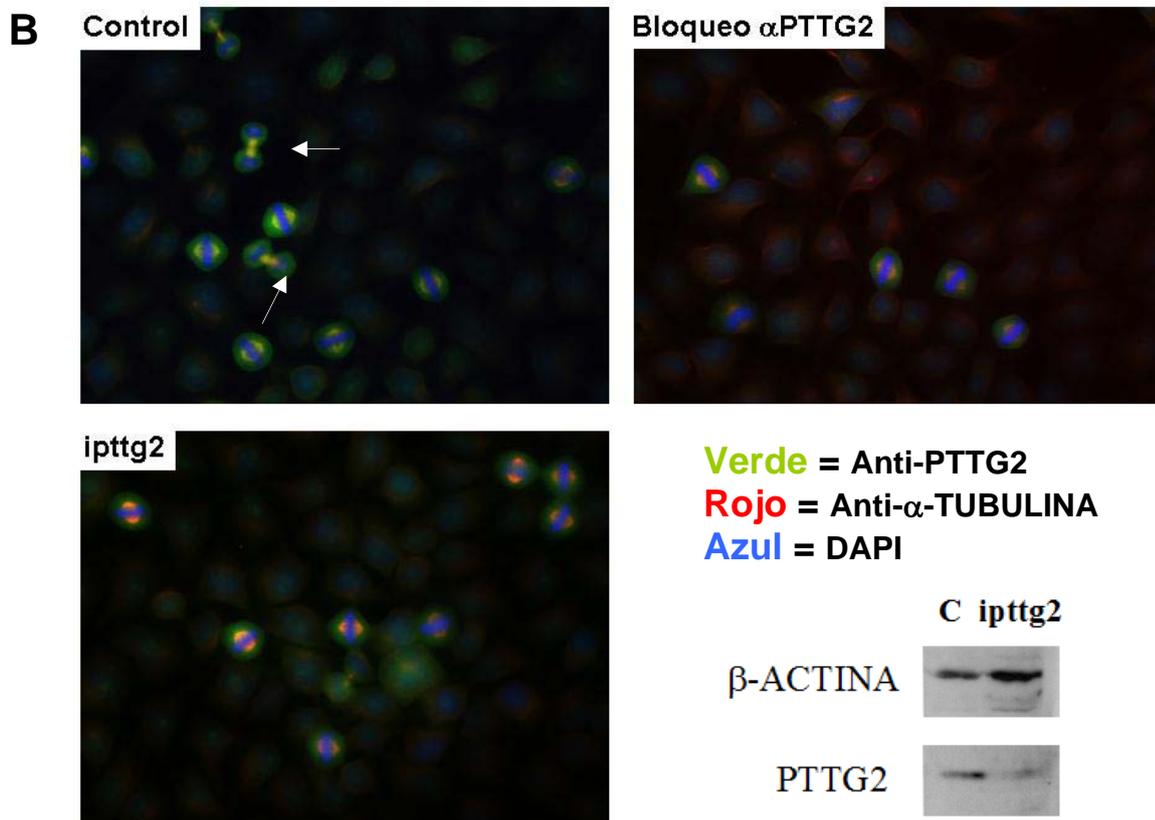
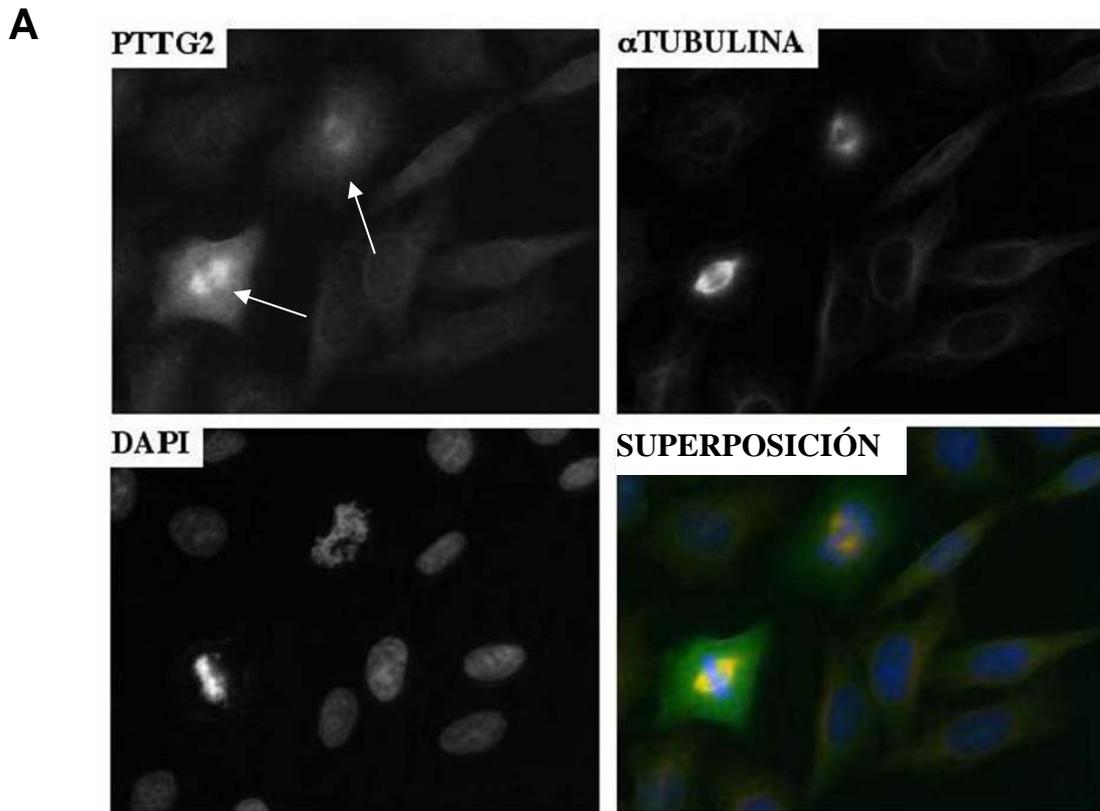
Figura 28. A. Western blot que muestra la disminución de proteína PTTG2 al aumentar la concentración de oligo de interferencia específico en la célula. Se transfectoron células HeLa con distintas concentraciones del iRNA específico para *pttg2* y como control se empleó

un oligo aleatorio que fue añadido a las células a la concentración mayor utilizada para interferir PTTG2. Las células se recogieron tras 60 horas para obtener los extractos totales con RIPA. **B. Inmunofluorescencia de células HeLa con el anticuerpo anti-PTTG2 purificado por cromatografía de afinidad (PTTG2 p. c.).** Dicho anticuerpo se obtuvo contra el péptido carboxilo terminal de PTTG2 que es distinto en PTTG1 y PTTG3, para evitar reacción cruzada con estas proteínas homólogas. Las flechas señalan células en metafase (la proteína ciclina B1 está muy elevada) que tienen un marcaje intenso con anti-PTTG2, en especial alrededor de los cromosomas. En el resto de las células en interfase sólo se marcan los núcleos. La superposición muestra la fusión de los canales verde (PTTG2), rojo (CICLINA B1) y azul (DAPI). **C. Expresión de PTTG2-FLAG en células HeLa.** A la izquierda se muestra un *western blot* de extractos totales después de 24 horas de transfección. Se revela con anti-FLAG y anti- β -ACTINA. A la derecha se muestra una inmunofluorescencia de las mismas células.

Para corroborar que dicha banda correspondía a PTTG2, se bloqueó el anticuerpo con el péptido específico, que eliminaba dicha señal (*datos no mostrados*) y, por otro lado, se interfirió con el oligo i2 a distintas concentraciones, observándose que la intensidad de la banda de 28 KDa disminuía significativamente (**Figura 28A**).

Los anticuerpos purificados se emplearon para determinar mediante inmunofluorescencia la localización específica de esta proteína. Cuando se utilizó el anticuerpo purificado por cromatografía de afinidad, el marcaje observado era nuclear en todas las fases del ciclo, aumentando en fase S, y sobre todo en mitosis, excluyendo la cromatina como ocurría con anti-PTTG1 (**Figura 28B**). Al sobreexpresar la proteína PTTG2 fusionada al epitopo FLAG, se confirmó esta localización nuclear (**Figura 28C**).

Para lograr marcajes más limpios, se purificó el anticuerpo anti-PTTG2 mediante membrana de nitrocelulosa. La inmunofluorescencia empleando dicho anticuerpo revelaba una señal muy específica en las células en mitosis que correspondía al huso mitótico, colocalizando con la proteína Tubulina (**Figura 29A**).



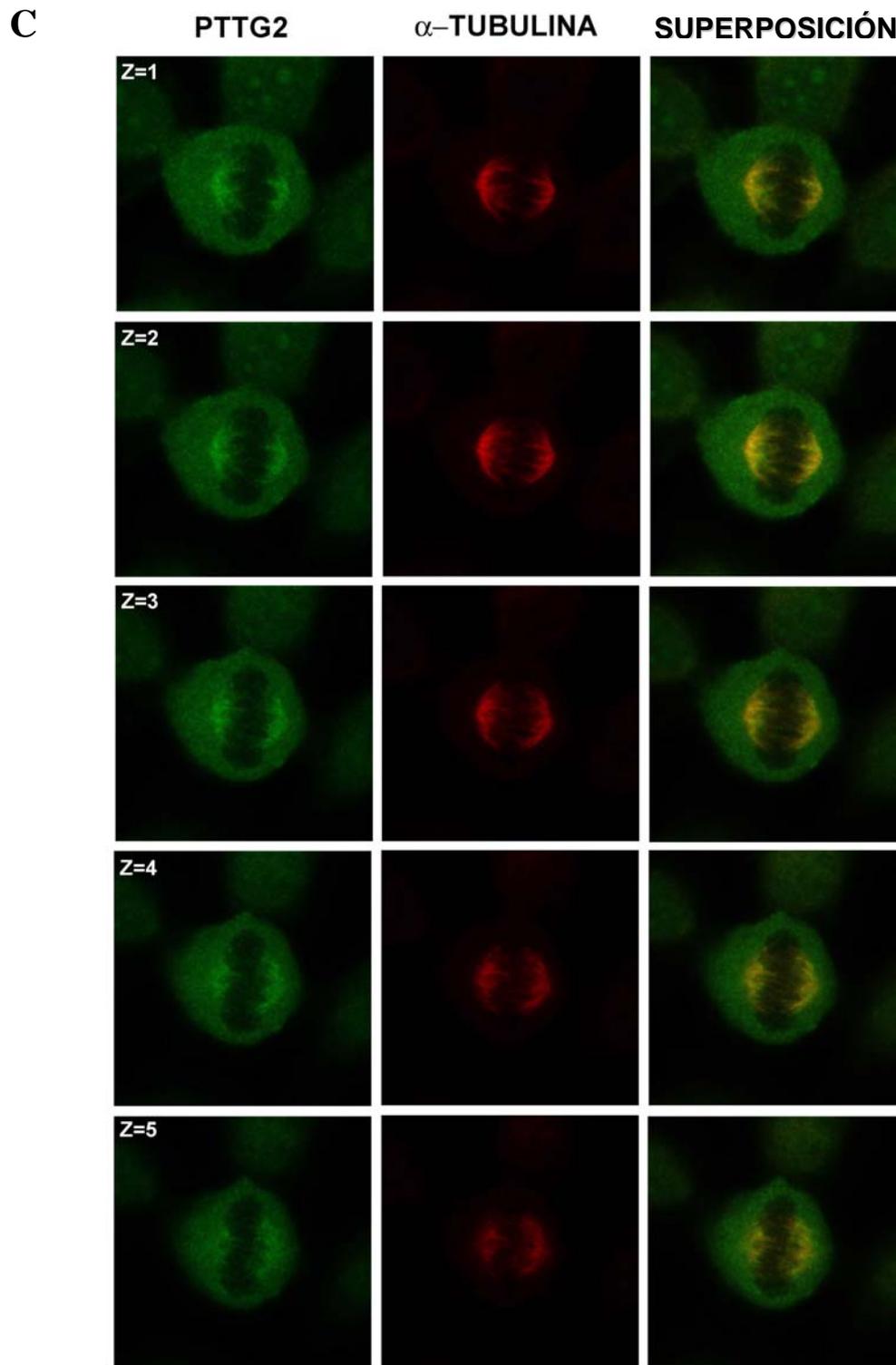


Figura 29. A. Inmunofluorescencia de células HeLa con el anticuerpo anti-PTTG2 purificado en membrana de nitrocelulosa. La purificación del anticuerpo por esta técnica permite obtener marcajes más específicos como se muestra en el primer panel de esta figura, donde el marcaje de PTTG2 en mitosis (flechas) claramente colocaliza con el huso mitótico

central. La superposición muestra la fusión de los canales verde (PTTG2), rojo (α -TUBULINA) y azul (DAPI). **B. Inmunofluorescencia de células HeLa en mitosis.** El panel superior izquierdo muestra la fusión de los canales verde (PTTG2), rojo (α -TUBULINA) y azul (DAPI). El marcaje de PTTG2 purificado de membrana abarca tanto al huso mitótico central como a los puentes de Tubulina que permanecen tras la telofase, cuando todavía no existen dos células hijas totalmente independientes (flechas). El panel inferior muestra una inmunocitoquímica con los mismos anticuerpos pero de células que han sido previamente interferidas durante 60 horas con el oligo específico frente a PTTG2 a 240 nM. El WB correspondiente está a su derecha. El panel superior derecho muestra una inmunofluorescencia de células control donde previamente a la incubación con el anticuerpo primario se ha bloqueado el anticuerpo anti-PTTG2 con el péptido utilizado como antígeno para su generación en conejo. **C. Imágenes de los distintos planos en Z de una célula en metafase, tomadas en microscopio confocal desde la misma inmunocitoquímica mostrada en "B".** PTTG2 (verde), α -TUBULINA (rojo), SUPERPOSICIÓN (fusión de ambos canales).

En paralelo al bloqueo del anticuerpo anti-PTTG2 (purificado desde membrana) con su péptido específico que hacía desaparecer la banda de 28 KDa en WB, se llevó a cabo una inmunocitoquímica de células HeLa observando que el marcaje del huso mitótico disminuía significativamente (**Figura 29B, panel superior derecho**). Igualmente, en paralelo a las interferencias correspondientes a la figura 28A, se llevó a cabo la inmunofluorescencia de las células interferidas y se observó de nuevo la disminución del marcaje específico del huso mitótico (**Figura 29B, panel inferior**).

Para corroborar este marcaje específico del huso mitótico, se tomaron distintas imágenes en Z de células HeLa en mitosis y se pudo observar que la localización de PTTG2 se concentraba en el huso mitótico central de las células, colocalizando con la proteína Tubulina (**Figura 29C**).

3.2. Efectos de la supresión de PTTG2 en las células

Una vez estudiada la localización subcelular de PTTG2 y comprobando que la proteína se expresaba en células HeLa (peso aparente en WB de 28

kDa), se trató de corroborar los efectos derivados específicamente de su supresión mediante RNA de interferencia.

Se interfirieron células HeLa con 240 nM de i2 y se analizó el ciclo celular a distintos tiempos. Tras 24-48 horas de interferencia se observó un discreto aumento de la fase S, pero no se detectó un pico subG1. Sin embargo, a las 72 horas de interferencia se observó un 16% de muerte celular, manteniéndose la fase S aumentada con respecto al control (**Figura 30A y B**).

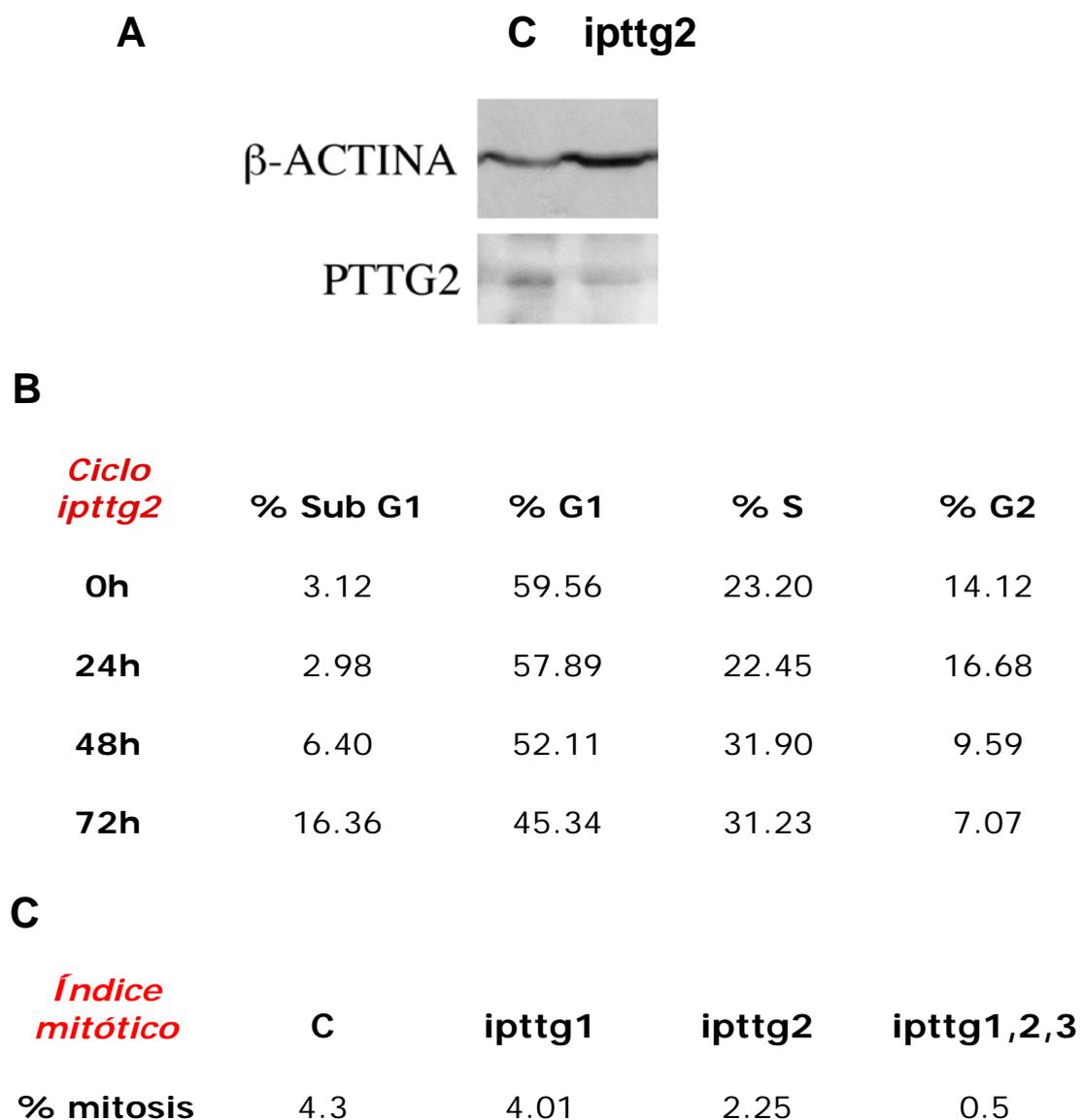


Figura 30. A. Western blot que muestra los niveles de PTTG2 antes (C) y después de interferir con el oligo i2 a 240 nM final. Las células se recogieron 60 horas después de la

interferencia para extraer la proteína total. **B. Tabla que muestra los porcentajes de células en las diferentes fases del ciclo, incluyendo subG1, después de interferir con el oligo i2 (240 nM final), a 24, 48 y 72 horas. C. Tabla que muestra el porcentaje de células HeLa en mitosis tras 72 horas de interferir Pttg1, Pttg2 ó bien las tres proteínas homólogas.** Los datos mostrados en B y C son la media de tres experimentos independientes.

En paralelo, se analizó el índice mitótico de las células interferidas con i2, a la vez que se interfirió con i1 e i1,2,3 a la misma concentración (**Figura 30C**). Se observó que los efectos de muerte celular tras la supresión de Pttg2 eran más notables (**Figura 30B, 72 horas de interferencia**) y el índice mitótico era aproximadamente la mitad; estos efectos eran más notables en células en las que se interferían las tres isoformas. Sin embargo, el índice mitótico era similar en las células control y en las interferidas contra Pttg1 (**Figura 30C**).

Se analizó por WB la rotura de la proteína PARP-1 (como medida de apoptosis) en las células interferidas con cada uno de los iRNAs específicos de las tres isoformas de PTTG (i1, i2 e i3); de nuevo, se confirmó que la supresión de PTTG2 inducía muerte celular programada (**Figura 31A**). El porcentaje (16%) de células en subG1 al interferir la expresión de Pttg2 era ligeramente inferior al porcentaje de muerte celular (en torno al 22%) cuantificado mediante tinción con azul de tripano, diferencias inherentes probablemente a las distintas metodologías utilizadas.

Ya que los primeros efectos de la supresión de Pttg2 se observaban en fase S, se analizaron por *western blots* los niveles de proteína en las distintas fases del ciclo. Como muestra la figura 31B, los niveles más altos de PTTG2 correspondían a la fase S, mientras que los de PTTG1 correspondían a la fase G2/M.

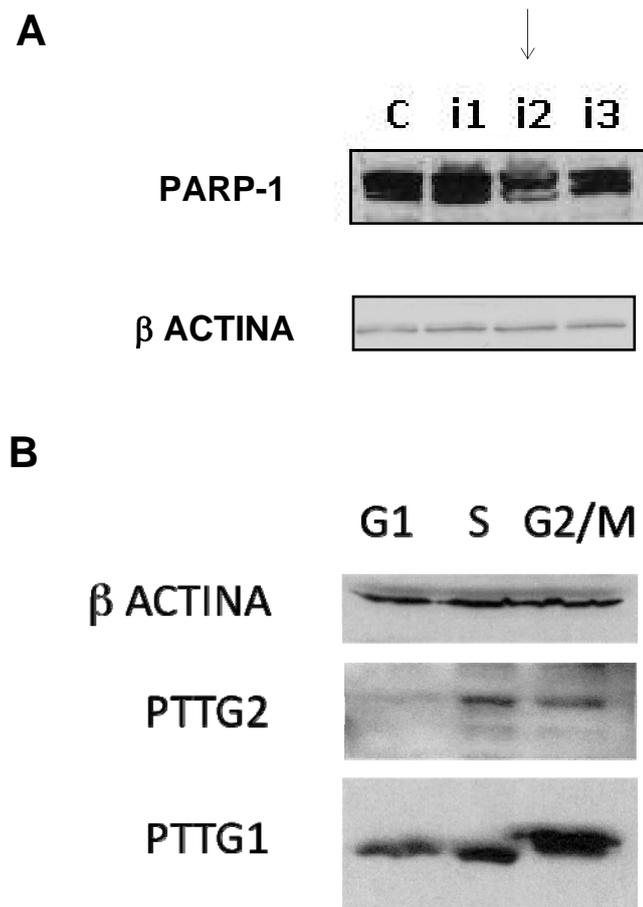


Figura 31. A. Rotura de PARP-1. Se interfirieron células HeLa con los oligos i1, i2 e i3 a una concentración final de 240 nM, y tras 72 horas se analizó por *western blot* el fragmento correspondiente a la proteína PARP-1 completa (116 KDa). La proteína β -ACTINA se utilizó como control de carga. **B. Niveles de PTTG2 en las distintas fases del ciclo.** Se sincronizaron células HeLa en las diferentes fases del ciclo (G1: retirada de suero; S: doble bloqueo con timidina; G2/M: nocodazol) y se analizaron los niveles de PTTG1, PTTG2 y β -ACTINA en extractos totales RIPA.

3.3. Localización subcelular de PTTG3

Se obtuvieron dos antisueros distintos contra la proteína completa PTTG3 (PTTG3-His y PTTG3). Ambos se purificaron, tanto por cromatografía de afinidad en columna como mediante membrana de nitrocelulosa, y fueron

analizados frente a una variedad de extractos celulares diferentes, una vez comprobado que reconocían en WB la proteína recombinante PTTG3-His.

El antisuero obtenido contra la proteína recombinante PTTG3-His no reconocía proteína alguna en los extractos celulares ensayados, a pesar de reconocer la proteína recombinante. Sin embargo, el antisuero contra la proteína PTTG3 intacta, purificado por cromatografía de afinidad en columna con PTTG3-His unida covalentemente a la resina sefarosa, reconocía una banda en torno a 29 KDa en células carentes de PTTG1 (HCT116^{Sec-/-}). Esta banda de 29 KDa (mismo peso aparente que PTTG1) se observaba también claramente en WB de extractos silvestres HCT116, así como de otras líneas celulares ensayadas (HeLa, RPE-1, etc.). En experimentos de sobreexpresión, el anticuerpo purificado reconocía la proteína PTTG3-FLAG (corroborado con anticuerpo anti-FLAG) (**Figura 32**).

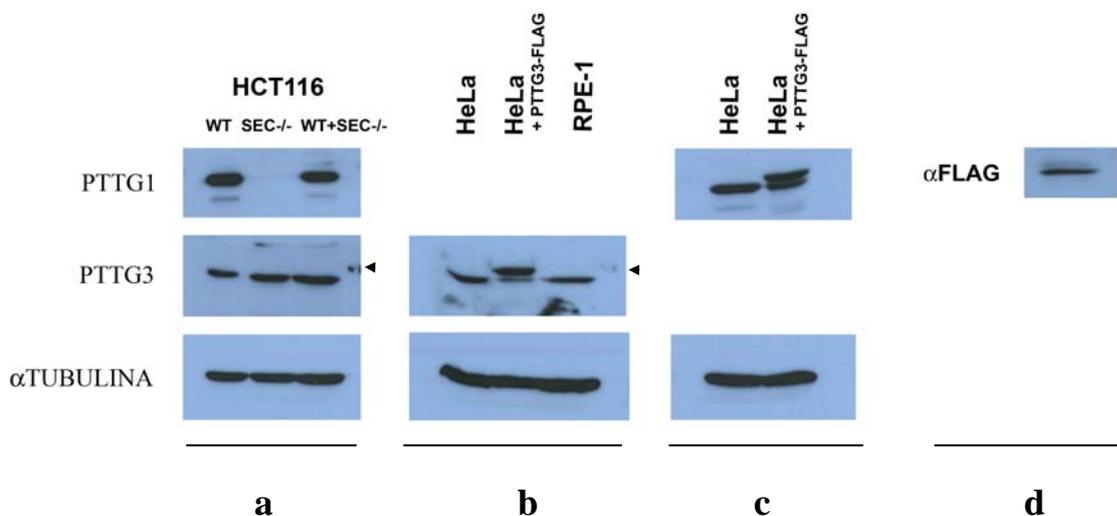
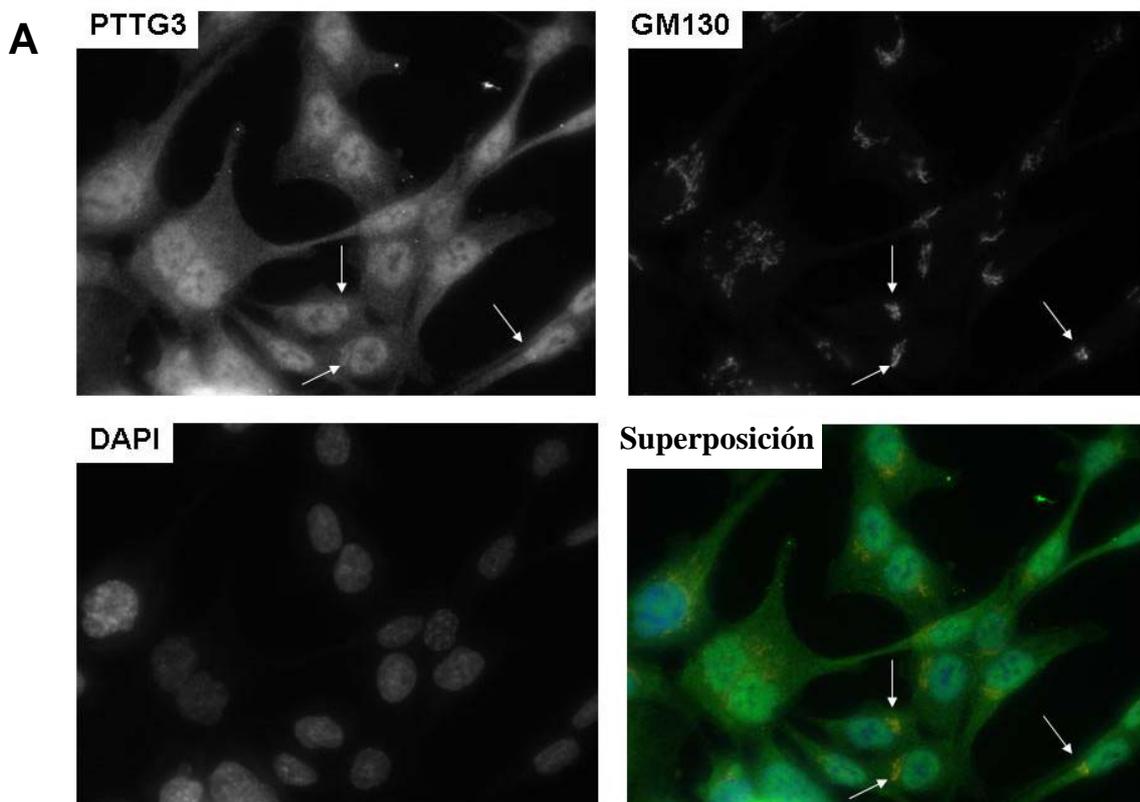


Figura 32. Western blots de extractos con y sin PTTG1 y sobreexpresando o no la proteína PTTG3. El anticuerpo frente a PTTG3 fue purificado mediante adsorción a la proteína de fusión PTTG3-His y posterior elución mediante pH ácido (glicina). Se utilizó a una dilución 1:300 en los WB mostrados. El anticuerpo frente a PTTG1 reconoce la proteína PTTG3 en sobreexpresión (c, panel superior, “HeLa + PTTG3-FLAG”), pero no la proteína endógena PTTG3, como se observa en el extracto de HCT116^{Sec-/-} (a, panel superior, “SEC-/-“). El anticuerpo frente a PTTG3 reconoce una proteína por debajo de 31 KDa (flecha) en todos los extractos celulares estudiados

(HCT116^{WT}, HCT116^{Sec-/-}, HeLa y RPE-1). En los paneles inferiores de a, b y c se muestra la proteína α -Tubulina como control de carga. El panel d muestra el mismo WB que en c (panel superior, "HeLa + PTTG3-FLAG") pero revelado con un anticuerpo anti-FLAG que reconoce la proteína sobreexpresada PTTG3-FLAG.

En la inmunocitoquímica de células HCT116^{Sec-/-} el anticuerpo anti-PTTG3 marcaba tanto el núcleo como el aparato de Golgi (**Figura 33A**). Ya que dichas células no expresaban PTTG1, el marcaje observado correspondería a PTTG3. Así, al igual que PTTG1, PTTG3 se localizaría en el aparato de Golgi. Este resultado explicaría el marcaje de Golgi observado en células carentes de PTTG1 (**Figuras 21 y 22**) debido a la probable reacción cruzada entre este anticuerpo y la proteína nativa PTTG3 [la proteína PTTG3 desnaturalizada, sin embargo, no era reconocida por el anticuerpo anti-PTTG1 como se mostró en la figura 32 (a, panel superior, "SEC-/-")].



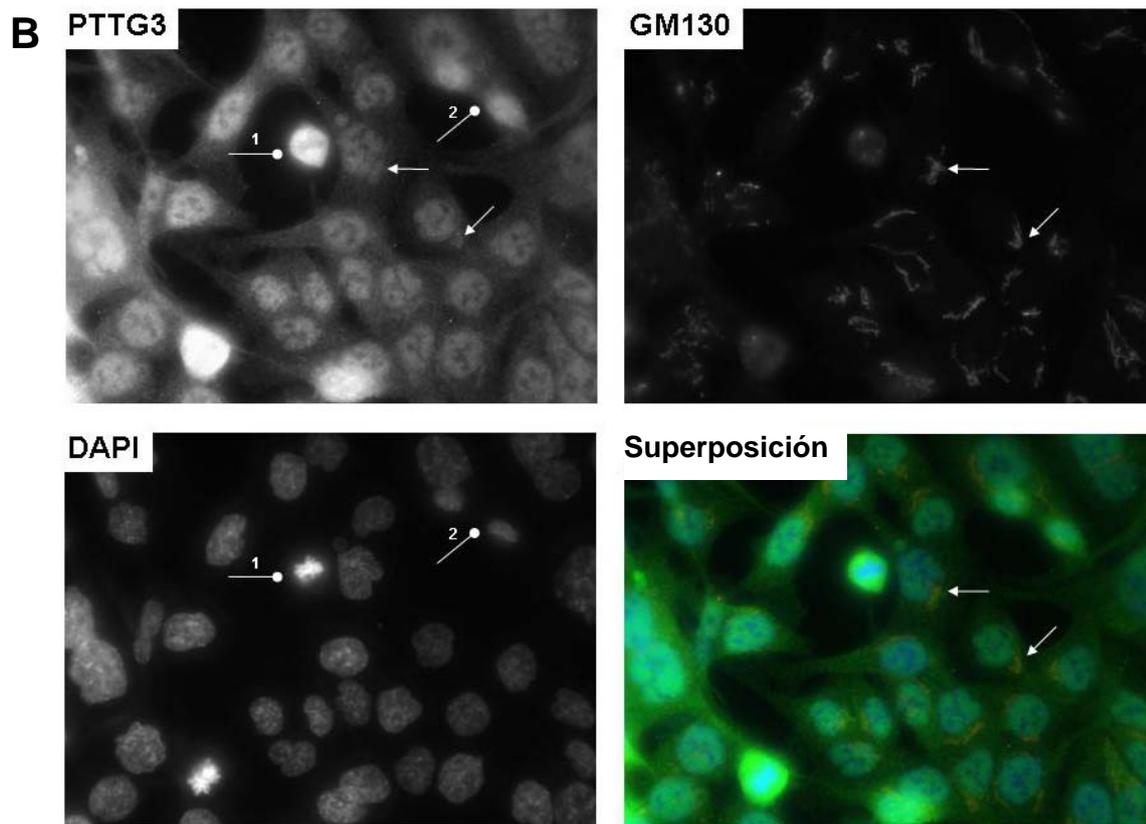


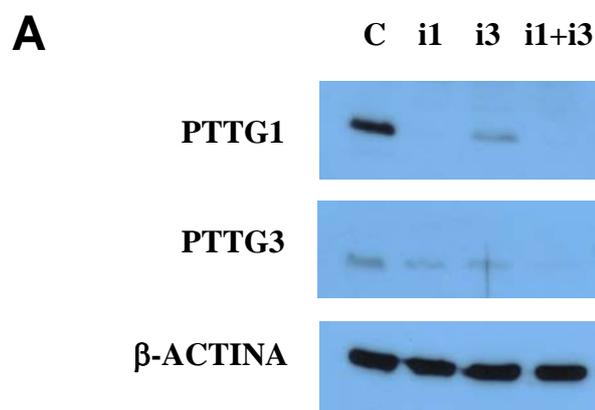
Figura 33. A y B. Inmunocitoquímica de células HCT116 Sec^{-/-} empleando un anticuerpo frente a PTTG3. Los paneles indicados como “PTTG3” muestran el marcaje específico del anticuerpo anti-PTTG3, purificado por cromatografía de afinidad, en células carentes de PTTG1 (HCT116 Sec^{-/-}). Los paneles indicados como “GM130” muestran el marcaje específico de Golgi. Con flechas se indican algunas de las células donde el Golgi se observa claramente marcado con el anticuerpo frente a PTTG3, colocalizando parcialmente con GM130, según indica la superposición, donde se ve la fusión de los canales verde (PTTG3), rojo (GM130) y azul (DAPI). La flecha 1 señala una célula en metafase y la flecha 2 en telofase tardía.

Del mismo modo, hay que subrayar que las células carentes de PTTG1 presentan un marcaje intenso en metafase con el anticuerpo anti-PTTG3 (**Figura 33B, segundo panel, flechas 1 y 2**). Esto indicaba que los niveles de PTTG3, al igual que los de PTTG1, son más elevados en metafase.

A continuación, se analizó si la interferencia específica de PTTG3 eliminaba la banda de 29 KDa en WB. Debido a la dificultad que presentaban las células HCT116 para ser interferidas, se escogieron las células RPE-1 para estos estudios. Cuando se interfirió con el oligo específico frente a PTTG1, se observaba claramente la bajada de la proteína por WB (**Figura 34A**) al igual que la desaparición de la proteína citosólica por inmunofluorescencia. El marcaje de Golgi, como ya se indicó anteriormente, se mantenía (**Figura 34C**). El mismo resultado se obtuvo al interferir con el iRNA frente a PTTG3 (**Figura 34A y Figura 34D**).

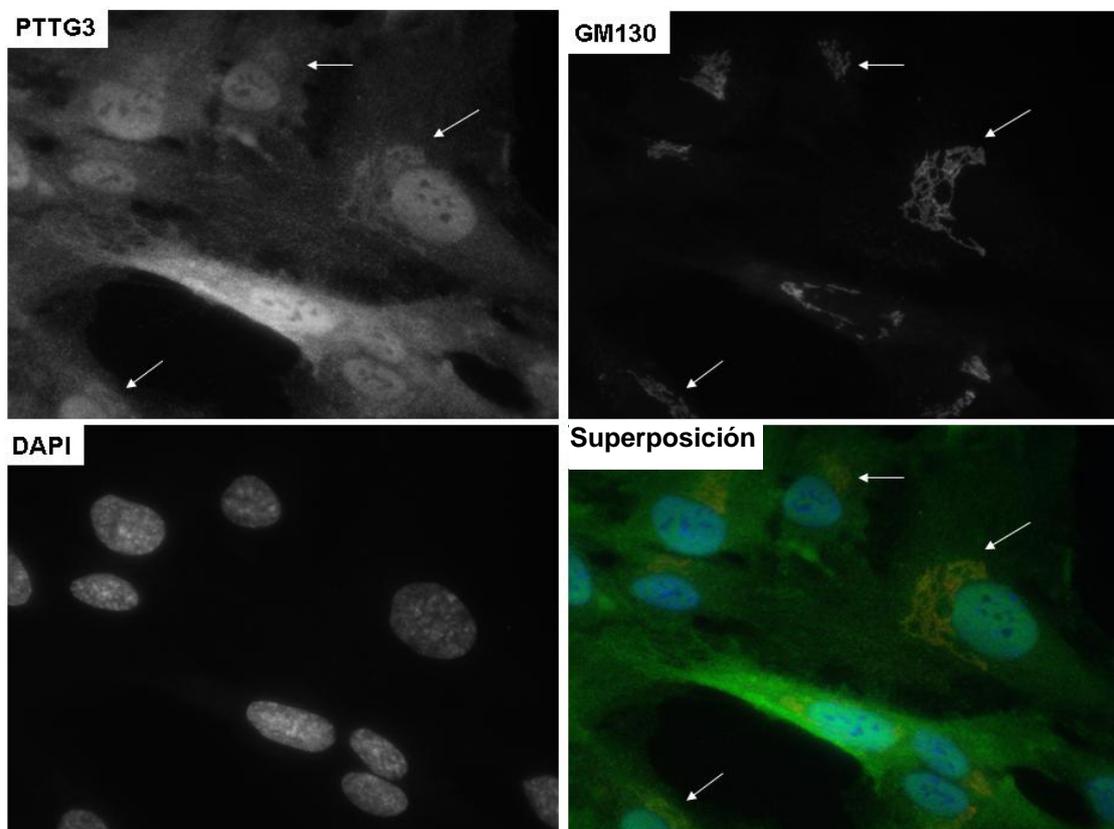
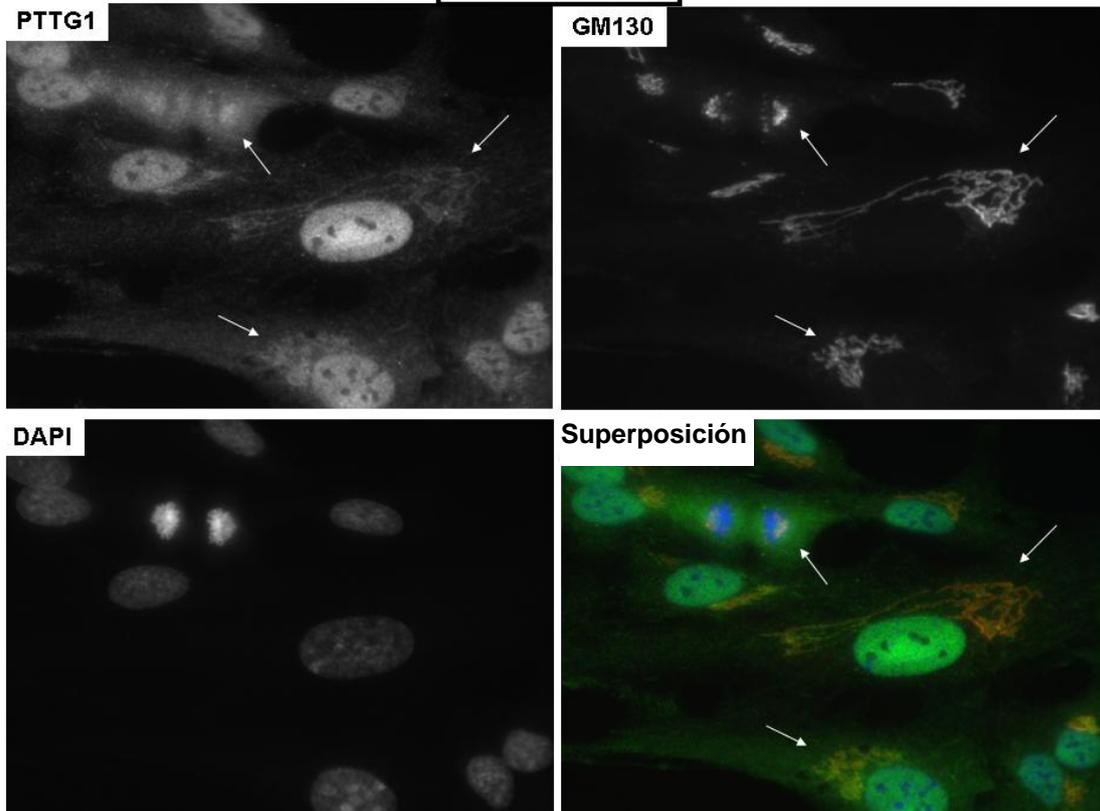
Como se observa en la figura 34B, el anticuerpo frente a PTTG3 reconoce la proteína nativa PTTG1 (marcaje citosólico de las inmunocitoquímicas sobre RPE-1). Únicamente la interferencia de PTTG1 conjuntamente con la de PTTG3 (i1,3) hacía desaparecer completamente el marcaje de Golgi (**Figura 34E**).

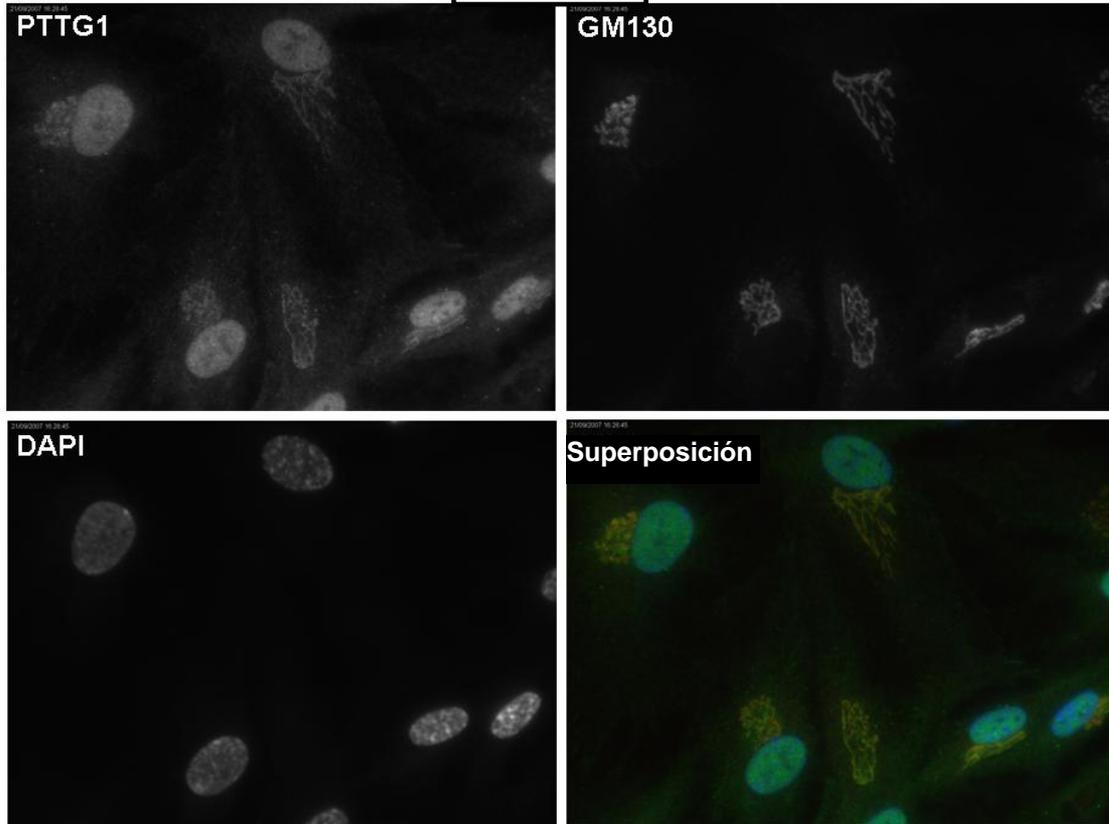
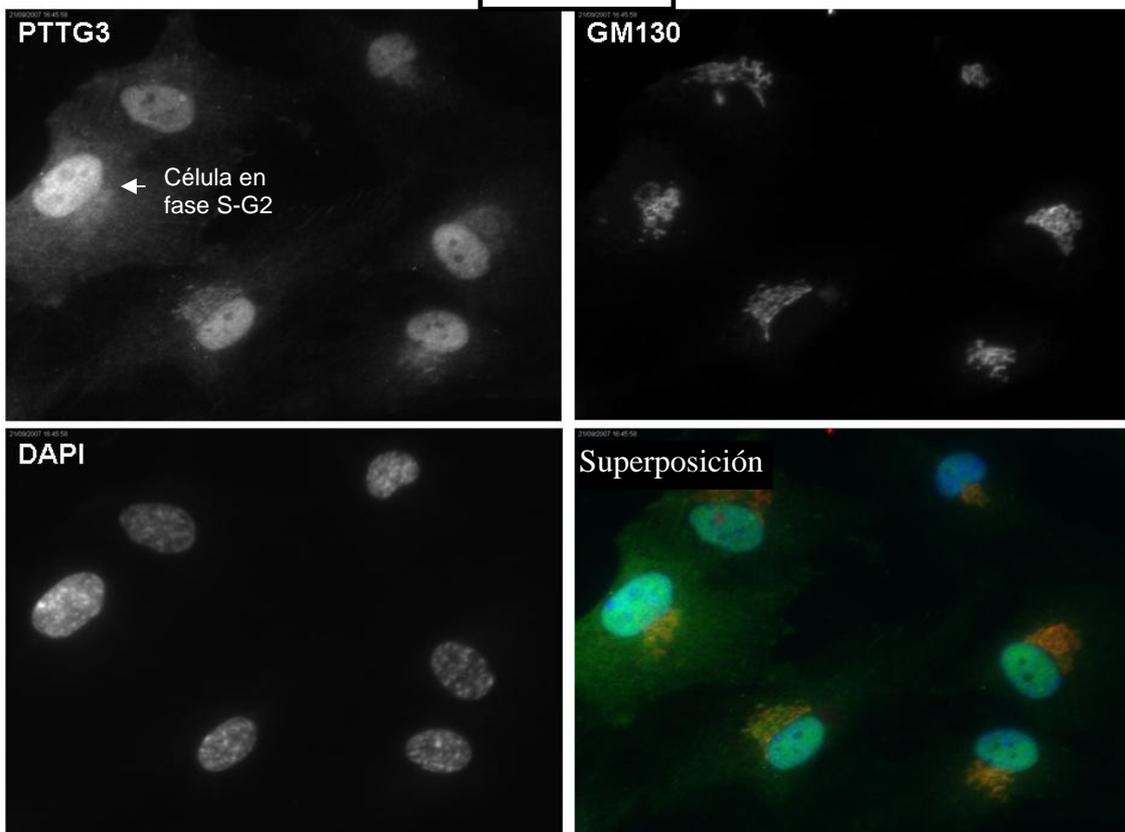
A partir de estos resultados, se puede concluir que PTTG3 es una proteína homóloga a PTTG1 que se localiza también en el aparato de Golgi de células normales y tumorales. Sin embargo, no se localiza en el citosol a juzgar por los resultados de las inmunocitoquímicas de células carentes de PTTG1 (**Figura 33 A y B**).



B

CONTROL



C**iPTTG1****D****iPTTG3**

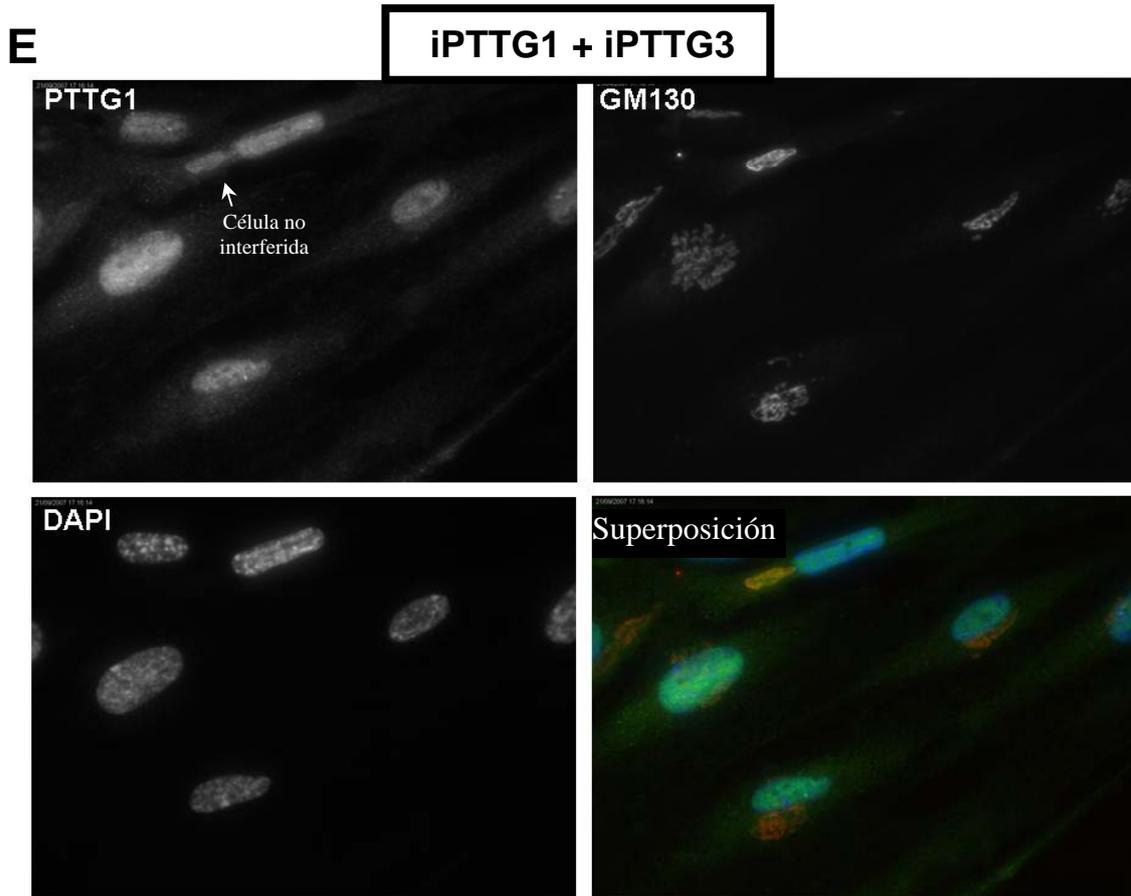


Figura 34. **A.** *Western blot* que muestra la disminución de los niveles de proteína PTTG1 y/o PTTG3 tras interferir con cada uno de los iRNAs específicos (i1 ó i3) o bien con una combinación de ambos (i1+i3). La banda específica por debajo de 31 KDa desaparece al interferir conjuntamente con ambos oligos. **B.** Inmunocitoquímica de células control empleando el anticuerpo anti-PTTG1 (superior) o anti-PTTG3 (inferior). El marcaje de Golgi colocaliza con el marcador GM130. La superposición muestra la fusión de los canales verde (PTTG1 ó PTTG3), rojo (GM130) y azul (DAPI). **C.** Inmunocitoquímica de células interferidas con i1. La mayor parte de la proteína citosólica desaparece y el marcaje de Golgi permanece, observándose con mayor claridad. La superposición muestra la fusión de los canales verde (PTTG1), rojo (GM130) y azul (DAPI). **D.** Ídem a C pero empleando el iRNA frente a PTTG3. En este caso la proteína citosólica permanece, pues PTTG3 no está en citosol como se había comprobado en las inmunocitoquímicas de células HCT116Sec^{-/-} (la flecha señala una célula en fase S o G2 del ciclo que acumula proteína citosólica y nuclear). **E.** Inmunocitoquímica de células interferidas conjuntamente con los oligos i1 e i3. Sólo en este caso el marcaje de Golgi con anti-PTTG1 desaparece, permaneciendo exclusivamente en las células no interferidas (flecha). La superposición muestra la fusión de los canales verde (PTTG1), rojo (GM130) y azul (DAPI).

Ensayos de coimmunoprecipitación, utilizando extractos totales de células HCT116^{WT} y HCT116^{Sec^{-/-}}, han corroborado que el anticuerpo anti-PTTG1 reconocía la proteína PTTG3 en su estado nativo (**Figura 35**). Existía, por tanto, una reacción cruzada entre estos anticuerpos, indicando que sólo interfiriendo ambas proteínas, PTTG1 y PTTG3, desapareciese el marcaje de Golgi en las inmunocitoquímicas.

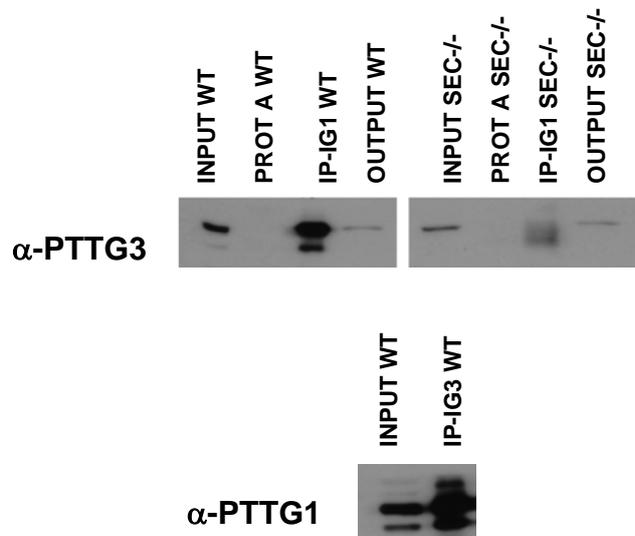


Figura 35. Western blot que muestra la inmunoprecipitación desde extractos HCT116^{WT} y HCT116^{Sec^{-/-}} empleando anticuerpos anti-PTTG1 y anti-PTTG3. El anticuerpo anti-PTTG1 reconoce la proteína nativa PTTG3 tanto en células silvestres como en células HCT116^{Sec^{-/-}} (se detecta en los inmunoprecipitados y el extracto es depletado eficientemente). Al mismo tiempo, PTTG3 reconoce a PTTG1 en los inmunoprecipitados. Lo mismo ocurre a la inversa al inmunoprecipitar con anti-PTTG3 la proteína PTTG1 nativa desde extractos totales de células HCT116^{WT}. “INPUT”: 10 μ l de extracto total empleado en las inmunoprecipitaciones. “PROTEÍNA A”: Extracto unido a las bolas-proteína A de forma inespecífica. “IP-IG1”: Inmunoprecipitados con anti-PTTG1. “IP-IG3”: Inmunoprecipitados con anti-PTTG3. “WT”: extracto proteico total de células HCT116^{WT}. “SEC^{-/-}”: extracto proteico total de células HCT116^{Sec^{-/-}}.

VI. DISCUSIÓN

1. IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA PTTG1 EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *dlk1* EN PROCESOS DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN

En esta Tesis Doctoral hemos estudiado la capacidad transactivadora de PTTG1 y analizado su efecto sobre la expresión génica de la célula. Para ello, se han generado células no tumorales NIH3T3 que expresan PTTG1 bajo un promotor inducible. La comparación de las poblaciones de mRNAs de células control y células que sobreexpresan PTTG1 ha permitido determinar los genes cuya expresión está afectada.

Se ha demostrado que *dlk1* es uno de los genes cuya expresión está más afectada por la sobreexpresión de PTTG1. *dlk1* codifica una proteína homeótica de 385 aminoácidos que contiene un dominio extracelular con 6 repeticiones similares al dominio del EGF (*E*pidermal *G*rowth *F*actor). Participa en la diferenciación adipocítica (*Garces et al., 1999*) y hematopoyética (*Kogoshi et al., 2005; Langer et al., 2004*) y está implicada en el desarrollo embrionario y en el desarrollo de los linfocitos T y B (*Benedito y Duarte, 2005; Tsukamoto et al., 2005; Ciofani y Zuniga-Pflucker, 2005; de La Coste et al., 2005; Manilay et al., 2005; Raghunandan et al., 2008*). El gen *dlk1* se expresa abundantemente en neuroblastomas, carcinomas de pulmón y tumores endocrinos, lo que sugiere que podría estar involucrado en procesos tumorigénicos (*Yin et al., 2006; Murata-Ohsawa et al., 2005; Langer et al., 2004; Hsiao et al., 2005*).

dlk1 se aisló a partir de una línea celular embrionaria preadipocítica de ratón, NIH3T3-L1, como un gen que se expresaba específicamente durante el proceso de diferenciación de los adipocitos (*Smas et al., 1996*). Durante la diferenciación de los preadipocitos, los niveles del transcrito *Dlk1* disminuyen, siendo indetectables en adipocitos maduros. Numerosos estudios han mostrado que la expresión forzada de *DLK1* inhibe la adipogénesis mientras que su supresión promueve este proceso (*Smas et al., 1998; Smas et al., 1993*;

Moon et al, 2002; Lee et al, 2003). Estos resultados sugerían que *dlk1* podría tener un importante papel en el mantenimiento del estado no diferenciado.

Ya que la expresión de *dlk1* está estrechamente asociada con la inhibición de la diferenciación celular y la tumorigénesis (*Li et al., 2005; Langer et al., 2004; Hsiao et al., 2005; Kogoshi et al., 2005*) y que existen niveles elevados de proteína DLK1 en células NIH3T3 después de la sobreexpresión de PTTG1, en este trabajo se ha estudiado la capacidad de PTTG1 de inhibir la diferenciación de las células NIH3T3-L1 (*Garcés et al., 1999*) y se ha analizado la posible implicación e interacción de estos genes en procesos de tumorigénesis y diferenciación. Se ha demostrado que la expresión elevada de DLK1 como consecuencia de la sobreexpresión constitutiva de PTTG1 mantiene el estado desdiferenciado de los preadipocitos, siendo ésta la primera vez que se demuestra la implicación del gen *pttg1* en el proceso adipogénico.

Aunque la sobreexpresión de PTTG1 afecta a los niveles de expresión de numerosos genes, se ha demostrado en este trabajo que su efecto sobre la diferenciación de los adipocitos está mediado específicamente por DLK1. De hecho, la sobreexpresión de PTTG1 seguida por un descenso de los niveles de DLK1 mediante un iRNA específico, permite la progresión del proceso de diferenciación adipocítica. Además, se ha observado una correlación en los niveles de PTTG1 y DLK1 en etapas tempranas del desarrollo del hígado fetal humano. Ambas proteínas son muy abundantes en el hígado embrionario de 3 semanas (estado inmaduro no diferenciado) y sus niveles descienden bruscamente tras la diferenciación del hígado (semana 15). Únicamente un subgrupo de células hematopoyéticas conserva la expresión de DLK1 en el estado diferenciado. De acuerdo con este resultado, Moore y sus colaboradores han demostrado que DLK1 participa en las interacciones célula a célula entre las células del hígado fetal estromal y los precursores hematopoyéticos (*Moore et al., 1997*).

En placenta, la expresión de ambos genes es paralela tanto a nivel de mRNA como de proteína. Los datos obtenidos del análisis inmunohistoquímico

apoyan el papel de DLK1 y PTTG1 en mantener el estado no diferenciado de las células proliferantes y sugieren que estos genes podrían jugar también un papel en la regulación de los cambios fisiológicos que ocurren en la placenta.

La expresión de PTTG1 y DLK1 también es paralela en distintos tumores. La sobreexpresión de DLK1 se ha demostrado en neuroblastomas y en líneas celulares de carcinomas de pulmón de células pequeñas (*Laborda et al, 1993*) y, más recientemente, en adenomas de hipófisis y feocromocitomas (*Altenberger et al, 2006*). DLK1 podría tener propiedades oncogénicas ya que una mayor expresión de esta proteína en líneas celulares de glioblastoma multiforme potencia el fenotipo transformante (*Yin et al., 2006*). También se ha observado una mayor expresión de DLK1 en hepatocitos embrionarios (*Jensen et al., 2004*), así como en hepatoblastomas (*Luo et al., 2006*).

La sobreexpresión de PTTG1 se ha descrito en diferentes tumores endocrinos, así como en tumores relacionados no endocrinos (*Heaney et al, 2000; Sáez et al., 1999; Sáez et al, 2006; Kakar et al., 2006*). Los niveles de PTTG1 se han correlacionado con la invasividad del tumor (*Heaney et al, 2000; Kakar et al., 2006*) y se ha identificado a *pttg1* como un gen asociado al proceso metastásico (*Rasmawamy et al., 2003; Claxton y Fruttiger, 2005*).

Los resultados de este trabajo muestran la existencia de una correlación entre la expresión de *pttg1* y *dlk1* tanto a nivel de RNA mensajero como de proteína en adenomas de hipófisis y adenocarcinomas de mama. Esta correlación también se ha demostrado en neuroblastomas mediante inmunohistoquímica. Así, la expresión de *pttg1* y *dlk1*, que está restringida a un escaso número de tejidos, aumenta de forma considerable en el 80 y 80.9% de los neuroblastomas y adenomas de hipófisis analizados, respectivamente, y en el 73.9 % de los adenocarcinomas de mama.

A pesar de haber realizado diferentes ensayos empleando fragmentos de distinto tamaño del promotor de *dlk1* fusionado al gen de la luciferasa, no se ha conseguido demostrar el aumento de la actividad luciferasa al aumentar los

niveles de la proteína PTTG1. Sin embargo, recientemente hemos demostrado que la proteína PTTG1 estabiliza y aumenta la vida media del mRNA Dlk1, y este efecto parece dependiente de la interacción de PTTG1 con otros factores proteicos (*Espina et al., 2009*). No se descarta, sin embargo, que la actividad de transactivación de PTTG1 sobre *dlk1* pudiera estar asociada a otras regiones promotoras no incluidas en los fragmentos de promotor utilizados en los ensayos realizados durante esta Tesis.

Estudios de expresión génica evidencian que determinadas rutas de transducción de señales específicas de etapas embrionarias resurgen durante el desarrollo de ciertos tumores y que las células tumorales más agresivas comparten muchas propiedades con las células embrionarias (*Topczewska et al., 2006; Gupta et al., 2005*). Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos que, en algunos tumores, la coexpresión de PTTG1 y DLK1, dos proteínas expresadas en tejidos específicos y durante el desarrollo fetal, podría estar asociada a la aparición de fenotipos celulares menos diferenciados, y que la expresión combinada de estas proteínas facilitaría el crecimiento del tumor y la invasividad celular.

Los resultados presentados en esta Tesis demuestran por primera vez que la sobreexpresión de PTTG1 afecta al proceso de diferenciación de los preadipocitos y aporta nuevos datos sobre la convergencia de rutas de señalización tumorigénicas y embrionarias. La capacidad de PTTG1 de inducir el gen *dlk1* apoyaría la idea de que la sobreexpresión de la proteína PTTG1 favorecería el estado no diferenciado y la agresividad de muchos tumores, proporcionando una nueva diana a considerar en los procesos tumorales y un nuevo marcador indicativo de la agresividad del tumor.

2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PTTG1

La célula eucariota ha evolucionado funcionalmente conforme han ido apareciendo los compartimentos intracelulares. Esta compartimentación estructural y funcional determina que la célula lleve a cabo funciones específicas, y cualquier alteración en la localización intracelular puede acarrear trastornos patológicos serios.

La localización de PTTG1 en el aparato de Golgi (AG), demostrada en esta Tesis Doctoral, sugiere nuevas funciones inéditas de esta proteína asociadas o no a las conocidas hasta ahora (como función de securina y activador transcripcional). En la mayoría de las células animales no polarizadas, el AG es un orgánulo muy dinámico situado alrededor del centrosoma y compuesto por una serie de pilas formadas por cisternas aplanadas que están interconectadas entre sí por túbulos y vesículas (*Rambourg y Clermont, 1990*). El AG es el orgánulo responsable de la mayor parte de las modificaciones que sufren los lípidos y las proteínas una vez finalizada su síntesis en el retículo endoplásmico (RE) (*Driouch y Staehelin, 1997; Farquhar y Palade, 1998*). La modificación principal es la glicosilación, pero también se producen en el Golgi procesos de fosforilación, que son esenciales para el correcto transporte de ciertas proteínas solubles a los lisosomas, procesos de sulfatación y reacciones de proteólisis esenciales para la activación de ciertas hormonas.

Ya que el AG se encuentra estrechamente asociado al citoesqueleto (*Kreis et al., 1997*), los agentes que alteran la estructura de los microtúbulos y los microfilamentos afectan también la integridad y localización de este orgánulo. En particular, la despolimerización de los microtúbulos por nocodazol conlleva la fragmentación del Golgi en minicisternas que se dispersan por el citoplasma. Tanto el AG como las vesículas de transporte interaccionan con los microtúbulos a través de las proteínas motoras dineínas y quinesinas (*Allan, 1996*). En células no polarizadas, la dineína permite el movimiento hacia el

centrosoma, mientras que la quinesina lo hace hacia la membrana plasmática (Lane y Allan, 1998). Está ampliamente aceptado que el complejo multiproteico motor dinactina/ dineína es responsable del transporte desde el RE al AG, y de la localización del AG en el centro de la célula. De hecho, anticuerpos anti-dinactina marcan de forma intensa las regiones perinuclear y de Golgi (Vaughan et al., 1999).

En la primera parte de la sección de Resultados de esta Tesis se mostraba que en células que sobreexpresan PTTG1 disminuye significativamente la expresión del gen de la cadena ligera de la dineína citoplásmica, una de las subunidades repetidas de la dineína. La dineína asociada a los microtúbulos es necesaria para la estabilización de éstos y para la correcta orientación de los cinetocoros durante el alineamiento de los cromosomas en metafase (Yang et al., 2007; Vorozhko et al., 2008). Esta proteína es necesaria también para la formación del huso mitótico, su correcta focalización y su separación, así como para controlar su longitud (Sharp et al., 2000; Gatees y Kapoor, 2004; Goshima et al., 2005). La dineína se localiza en los cinetocoros libres de los cromosomas mitóticos y se disocia de ellos cuando éstos se unen a los microtúbulos del huso (King et al., 2000). La sobreexpresión de PTTG1 en distintos tumores no sólo afectaría la segregación cromosómica sino que también podría alterar la dinámica del huso mitótico controlada por dineínas, así como el transporte intracelular. En dicho transporte podría verse afectada, además, la proteína espectrina asociada al AG, cuya represión génica también se observa por *Differential Display*.

Según los resultados publicados por Takeo Minematsu (Minematsu et al., 2007), en células tumorales de hipófisis, PTTG1 se transportaría desde el AG al exterior de las células mediante vesículas de secreción, actuando como factor autocrino y/o paracrino de la tumorigénesis y la angiogénesis. Estos autores proponen que PTTG1 es una proteína que se secreta al medio intercelular, a pesar de no poseer en su estructura primaria ningún sitio de rotura. Sin embargo, en la secuencia de PTTG1 se localizan regiones hidrofóbicas similares a las contenidas en los factores de crecimiento FGF-9 y

FGF-16 que son responsables de la secreción de estos factores (*Miyakawa et al., 1999; Miyakawa et al., 2003*). Para la secreción de PTTG1 serían necesarios, según el grupo de Minematsu, los complejos coatómeros COP (*Coat Protein*). Estos complejos multiproteicos de transporte conectan el RE y el AG y son de dos tipos: los de tipo COPI y los de tipo COPII (*Kreis y Pepperkok, 1994*). Al autoensamblarse, deforman la membrana donadora para formar las evaginaciones que darán lugar a las vesículas. Las vesículas de tipo COPII se generan en el RE, y luego aparecen las de tipo COPI en un compartimento lábil y pleiomórfico formado por estructuras túbulo-vesiculares (VTCs=*Vesicular-Tubular Clusters*) localizadas entre el RE y el AG. Dicho compartimento recibe el nombre de ERGIC (*Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment*) (*Hauri et al., 2000*).

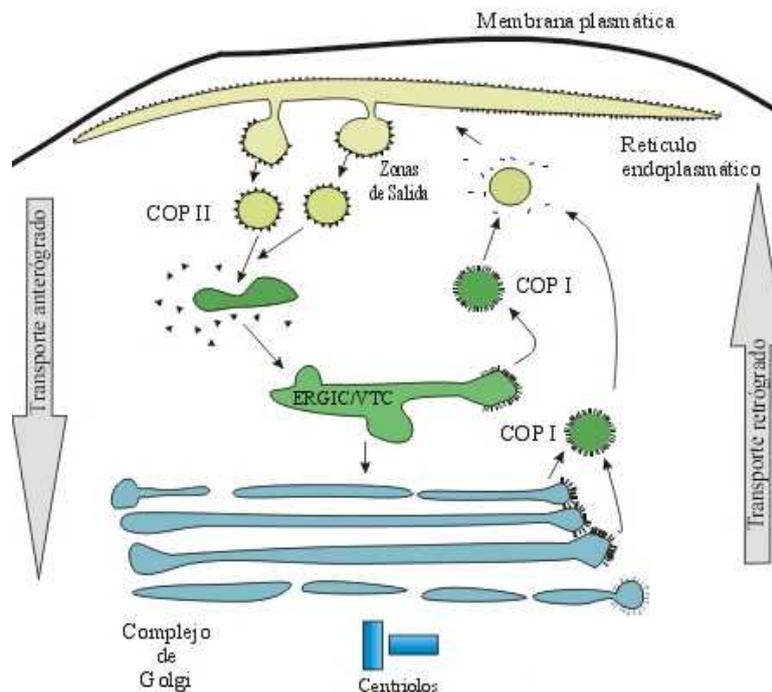


Figura XV. Esquema del transporte intracelular entre el retículo endoplásmico y el aparato (o complejo) de Golgi. El aparato de Golgi está englobado por el retículo endoplásmico y se sitúa alrededor de los centriolos. Entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi se sitúan las estructuras túbulo-vesiculares que forman el compartimento denominado ERGIC o VTC (complejo de transporte vesículo-tubular).

Las VTCs se consideran vesículas pre-Golgi. La integridad estructural del AG es el resultado del equilibrio entre el transporte RE-Golgi-Membrana plasmática (anterógrado) y el transporte Golgi-RE (retrógrado). Tanto el transporte anterógrado como el retrógrado tienen como intermediarios de membrana a las vesículas (**Figura XV**). Nuestro grupo ha demostrado mediante ensayos de *Pull Down* que PTTG1 está asociada al complejo coatómero COPI. No obstante, al analizar sobrenadantes de cultivo de diferentes líneas celulares (tumorales y no tumorales) que sobreexpresan PTTG1, no se ha confirmado su presencia extracelular.

El AG y el centrosoma tienen funciones relevantes en una gran variedad de procesos fisiológicos, tales como señalización intracelular, mitosis o apoptosis. De hecho, se ha identificado un elevado número de moléculas de transducción de señal localizadas en estos orgánulos (*Donaldson et al., 2000; De Matteis et al., 2002; Lange, 2002*). A este respecto, la proteína AKAP450, que se localiza tanto en el AG como en el centrosoma, tiene la capacidad de reclutar quinasas, fosfatasas y fosfodiesterasas, enzimas implicadas en la señalización dependiente de cAMP y Rho (*Schmidt et al. 1999; Takahashi et al., 1999; Witczak et al., 1999*). Recientemente, se ha demostrado que AKAP450, reclutado al cis-Golgi por la proteína GM130, tiene la capacidad por sí sola de nuclear microtúbulos y es la responsable de dicha capacidad de nucleación por parte del AG que hasta el año 2007 sólo era atribuida al centrosoma (*Efimov et al., 2007; Rivero et al., 2009*). También en este proceso de nucleación no centrosómico son necesarios los complejos dineína/dinactina para la correcta formación y anclaje de los microtúbulos que se originan en el AG (*Schroer, 2004; Kim, 2007*).

En nuestro laboratorio se ha demostrado recientemente que PTTG1 interacciona con GM130 *in vivo*. La interacción de PTTG1 con esta relevante proteína del cis-Golgi podría controlar la nucleación de microtúbulos desde el AG y, de forma similar a lo que sucede cuando se interfiere AKAP450 (*Rivero et al., 2009*), podría alterar la migración de las células. Según lo señalado

anteriormente sobre los resultados incluidos en el Capítulo I, la represión del gen de la cadena ligera de la dineína citoplásmica, desencadenada por la sobreexpresión de PTTG1, afectaría también la capacidad de nucleación de las células y otras funciones celulares dependientes de microtúbulos como la migración celular. Por otra parte, ya que tanto el AG como el centrosoma pueden iniciar el proceso apoptótico mediante sensores de estrés específicos y dirigir las señales que modulan la apoptosis al resto de la célula (*Ferri y Kroemer, 2001; Piekorz et al., 2002*), los niveles anómalos de PTTG1, presentes frecuentemente en diferentes tumores, y su localización en el AG, podrían alterar estas rutas de señalización favoreciendo la tumorigénesis.

Miembros de la familia Rho/Rac/Cdc42 se acumulan en la región del centrosoma y Golgi regulando algunas de sus funciones específicas. Así, la proteína ARAP1 se localiza en el AG y regula actividades celulares dependientes de Arf, Rho y Cdc42. De hecho, ARAP1 parece coordinar la remodelación de membranas y del citoesqueleto de actina que tienen lugar en el movimiento celular (*Miura et al., 2002*). Cdc42 regula la reorientación de la zona centrosoma/Golgi en fibroblastos que migran (*Noves y Hall, 1999; Palazzo et al., 2001*) y está implicada en la bi-orientación y estabilización de la unión de los microtúbulos y los cinetocoros cromosómicos. Esta proteína regula el alineamiento de los cromosomas en metafase y su segregación (*Narumiya et al., 2004*); de hecho, la actividad de CDC42 es máxima durante la metafase.

La proteína CDC42 regula la actividad de GM130 y ambas participan en la organización del centrosoma (*Konadi et al., 2009*). La proximidad del aparato de Golgi con el centrosoma es una disposición única en las células de mamífero. Debido a que GM130 no se detecta en el centrosoma, son necesarias otras proteínas que colaboren con ella en el proceso de orientación de los centrosomas en interfase y mitosis. El grupo de Andrew Konadi ha demostrado que CDC42 interacciona *in vivo* con GM130 y que ambas, junto con un factor GEF específico de CDC42 denominado Tuba, colaboran en la correcta orientación del centrosoma. La eliminación o inactivación de GM130, Tuba o CDC42 da lugar a centrosomas aberrantes incapaces de organizar los

microtúbulos durante interfase y mitosis (*Konadi et al., 2009*). En la primera parte de esta Tesis se ha demostrado que la sobreexpresión de PTTG1 en células NIH3T3 afecta significativamente los niveles de mRNA de CDC42, disminuyéndolos considerablemente (**Figura 3C, Capítulo I**). Este efecto de PTTG1 podría alterar la organización de los microtúbulos y del citoesqueleto de actina en interfase así como la distribución de los orgánulos y vesículas de secreción.

Al inicio de mitosis, en profase, el AG se fragmenta, distribuyéndose las fracciones resultantes entre las células hijas, en donde se reensamblan formando nuevas pilas al final de la mitosis. Los mecanismos moleculares que controlan la fragmentación del Golgi en mitosis y el reensamblaje posterior en las células hijas no son del todo conocidos. Se sabe, sin embargo, que en el desmantelamiento de las pilas del Golgi intervienen dos quinasas mitóticas, CDK1 (*cdc2*) y Plk, que fosforilan a la proteína GRASP65 que actúa a modo de “pegamento” entre las distintas pilas del Golgi. La fosforilación de GRASP65 desestructura los distintos complejos oligómeros de esta proteína y hace que las pilas se separen.

El complejo CDK1-ciclina B1 se localiza en interfase en el citosol y entra en el núcleo en profase tardía para unirse al aparato mitótico. Sin embargo, el complejo CDK1-ciclina B2 se localiza en Golgi. Estos complejos fosforilan proteínas que intervienen en mitosis, y sus proteínas dianas están determinadas por la localización subcelular de cada tipo de ciclina B (CIB1 y CIB2). Así, aunque ambos complejos intervienen en la fragmentación del Golgi, sólo CDK1-CIB1 interviene en los procesos de desorganización de la lámina nuclear, la condensación de los cromosomas y la formación del huso mitótico (*García-Mata et al, 2003; Sütterlin et al, 2002; Altan-Bonnet et al., 2003*).

CDK1, unida a la ciclina B1, fosforila en profase a GM130 (*Lowe et al., 1998*) y esta fosforilación bloquea su interacción con p115 en las vesículas de transporte del Golgi. La interacción GM130-p115 es fundamental para que las vesículas de transporte procedentes del RE se fusionen con las cisternas del

Golgi. Cuando el tráfico hacia el Golgi se interrumpe y al mismo tiempo siguen formándose vesículas por gemación desde el AG que van hasta el RE, el resultado neto es la desorganización del Golgi en vesículas.

La fragmentación del AG facilita la distribución equitativa de sus membranas entre las dos células hijas durante la división celular (*Shorter y Warren, 2002*) y es necesaria para la progresión mitótica (*Sütterlin et al., 2002; Hidalgo et al., 2004*). Al mismo tiempo, el ensamblaje del AG en telofase es esencial para su funcionalidad. Proteínas como GM130, GRASP65, p47 y Rab1, sustratos de la quinasa CDK1 (*cdc2*), son fundamentales para la fusión de membranas y el apilamiento de las cisternas.

PTTG1 también se fosforila en profase por CDK1 (*Domínguez et al., 1998*) y, al interaccionar con GM130, no se descarta su implicación en la regulación de la entrada en mitosis, ejerciendo una función adicional a la de securina. La fosforilación de PTTG1 por CDK1 impide su interacción *in vitro* con membranas de Golgi (datos recientes obtenidos por nuestro grupo de investigación), sugiriendo que su fosforilación en profase conllevaría su disociación del AG, de manera similar a como lo hace p115 (*Brandon et al., 2003; Diao et al., 2008*). De hecho, en metafase, PTTG1 no se detecta asociada a las microcisternas del AG, aunque la técnica de inmunofluorescencia sea limitante. Sin embargo, en telofase PTTG1 está de nuevo formando parte de las vesículas del Golgi (**Figura XVI**).

Ya que PTTG1 se degrada por el proteosoma en la transición metafase-anafase y que no hay síntesis proteica activa hasta telofase, la proteína asociada al AG en telofase sería bien PTTG1 no degradada, o bien PTTG1 sintetizada *de novo* en telofase. En el primer caso sería necesaria la desfosforilación de PTTG1 para su relocalización en el AG en telofase, siendo probablemente la fosfatasa PP2A la responsable de dicha desfosforilación (*Gil-Bernabé et al., 2006*). Finalizada la mitosis, dos ATPasas, junto con la fosfatasa PP2A, posibilitan el reagrupamiento de las vesículas de Golgi en cisternas, el apilamiento de éstas y la desfosforilación de las proteínas GRASP65 y GM130.

CDK1 es inactivada también durante telofase por fosforilación dependiente de la quinasa Myt1, con el fin de asegurar la desfosforilación de las proteínas citadas (GRASP65 Y GM130). PP2A (concretamente, su subunidad reguladora B55 δ) se asocia a PTTG1 en mitosis (*Gil-Bernabé et al., 2006*), lo que sugiere que es necesaria su desfosforilación, al igual que la desfosforilación de GM130, para el correcto ensamblaje del AG al final de la mitosis.

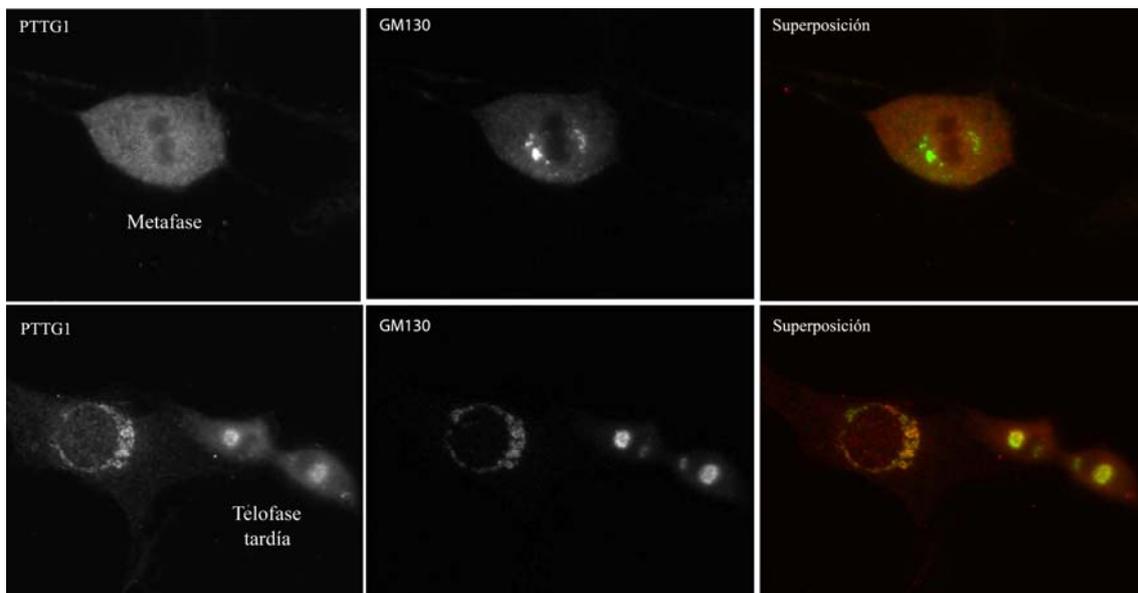


Figura XVI. Inmunocitoquímica de células NIH3T3 en mitosis. PTTG1: Rojo; GM130: Verde.

La proteína oncogénica RAS se localiza y activa en el AG. Esta compartimentación intracelular en la señalización de Ras está evolutivamente conservada; de hecho, un estudio en *S. pombe* reveló que dos rutas reguladas por Ras estaban controladas desde compartimentos intracelulares diferentes (*Oken et al., 2007*). Teniendo en cuenta que la activación de una misma ruta de señalización desde compartimentos celulares distintos confiere a la célula funciones biológicas distintas (*Walsh et al., 2001; Quatela et al., 2006; Kerry et al., 2008*), la localización de PTTG1 en el AG posibilita nuevas funciones de PTTG1 hasta el momento desconocidas, y putativas vías tumorigénicas por determinar.

3. CARACTERIZACIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS ISOFORMAS PTTG2 Y PTTG3. EFECTOS DE SU SILENCIAMIENTO EN LA CÉLULA

Varios trabajos han demostrado que en las células humanas la proteína PTTG1 es prescindible para que el ciclo celular se lleve a cabo de forma normal. Este hecho sugiere que existen mecanismos adicionales o redundantes que también controlan la correcta distribución de los cromosomas (*Mei et al., 2001; Wang et al., 2001b; Pflgebraar et al., 2005*). Dado que PTTG1 no es esencial para la viabilidad celular, en esta Tesis se ha estudiado la expresión y localización de sus genes homólogos, así como los efectos derivados de su interferencia génica. Se ha demostrado que la depleción de PTTG2 y PTTG3 causa un efecto de muerte celular drástico e independiente de PTTG1.

Se ha observado por inmunocitoquímica que células carentes de PTTG1, HCT116^{Sec^{-/-}}, se marcan con mayor intensidad en metafase que en telofase cuando se utiliza un anticuerpo frente a PTTG3. Esto ocurre también con anticuerpos anti-PTTG1 en todos los tipos celulares estudiados, de forma coherente con su función de securina. PTTG3 podría estar funcionando, por tanto, como securina en las células que carecen de PTTG1.

PTTG3 muestra un porcentaje de homología del 89% con PTTG1 y, según los resultados obtenidos en esta Tesis, se localiza también en el aparato de Golgi. La homología y localización de estas proteínas sugieren que en ausencia de PTTG1, las funciones celulares dependientes de ella se llevan a cabo por PTTG3. A pesar de generar y caracterizar varios anticuerpos frente a PTTG1 y PTTG3, el seguimiento de ambas proteínas endógenas en células silvestres es complejo debido a la reacción cruzada existente entre sus anticuerpos.

PTTG3, sobreexpresada ectópicamente, se localiza mayoritariamente en el citoplasma (**Figura XVII**). De hecho, el marcaje nuclear observado en las

inmunocitoquímicas realizadas para estudiar la proteína PTTG3 endógena podría ser una reacción cruzada del anticuerpo anti-PTTG3 con los epitopos homólogos de PTTG1 ó PTTG2.

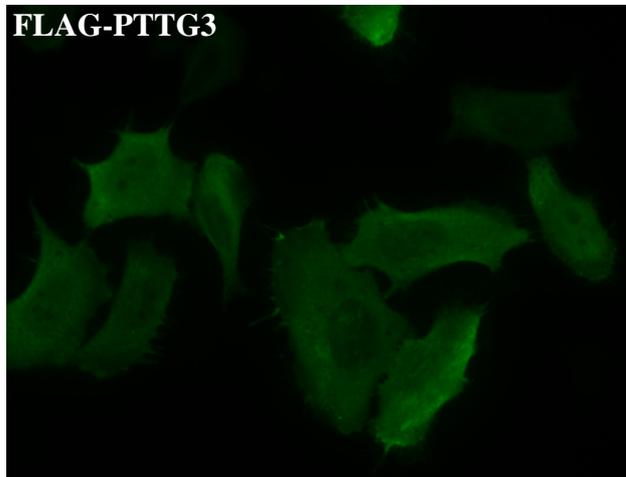


Figura XVII. Inmunofluorescencia de células HeLa expresando la construcción FLAG-PTTG3. Se empleó un anticuerpo monoclonal anti-FLAG.

PTTG2 es una proteína nuclear que se expresa a niveles muy bajos en la mayoría de los tejidos y muestra un patrón de expresión distinto a PTTG1. PTTG2 cicla al igual que PTTG1 pero, a diferencia de ésta, alcanza sus niveles máximos en fase S.

Para analizar el efecto de la carencia de las isoformas de PTTG1, se han utilizado siRNAs de interferencia específicos de los genes *pttg1*, *pttg2* y *pttg3*. Las células carentes de PTTG2 eran menos viables que las carentes de PTTG3 (la interferencia de *pttg1* no tiene efectos sobre la viabilidad). La menor viabilidad celular podría ser el reflejo del bloqueo del ciclo en fase S y de la inducción de apoptosis dependiente de p53 descrita en la sección de Resultados.

El grupo de Dong-Soo Im ha demostrado (*Jung et al., 2006*) que la supresión de la expresión de PTTG1 en la línea de carcinoma de colon HCT116 induce p53 y ésta desencadena apoptosis e inducción del gen *p21*. Los resultados de esta Tesis muestran que en células HeLa, U2OS, RPE-1 y

HCT116, la interferencia de PTTG1 produce un ligero aumento de la fase G1 del ciclo y un crecimiento ligeramente más lento de los cultivos PTTG1^{-/-} respecto a sus controles. La inducción de *p21* se observa por *western blot* en las líneas celulares señaladas de acuerdo a lo publicado por Chesnokova y colaboradores (Chesnokova et al, 2005; Chesnokova et al, 2007; Chesnokova et al, 2008). Este grupo ha demostrado que PTTG1 se une directamente al promotor del gen *p21*, reprimiendo su expresión. Ello explicaría el mayor porcentaje observado de células en fase G1 al interferir PTTG1. No obstante, dicho efecto parece independiente de p53, ya que los niveles de esta proteína son similares en condiciones control y de interferencia de *pttg1*. La ausencia de PTTG1 inhibe la ciclina D3 al igual que su sobreexpresión induce dicha ciclina (Tong et al., 2007), pudiendo también afectar la fase G1 del ciclo.

En ratones, la ausencia de PTTG1 no es letal, al igual que en la línea celular HCT116. En esta línea no se ha conseguido interferir, por razones técnicas, los genes *pttg2* y *pttg3*; sin embargo, se ha demostrado que estos genes son fundamentales para la viabilidad de la línea de carcinoma de cervix HeLa, y es la supresión de Pttg2, conjuntamente con Pttg3, la causante del mayor aumento de los niveles de p53.

Mediante los experimentos de inmunocitoquímica realizados en esta Tesis empleando anticuerpos específicos frente a PTTG2, se ha observado que dicha proteína se concentra durante la mitosis en el huso mitótico, sugiriendo que PTTG2 participaría también en el control de la dinámica de los microtúbulos en mitosis. De hecho, experimentos realizados recientemente en nuestro laboratorio utilizando la técnica de *Phage display* han puesto de manifiesto la interacción de PTTG2 con la proteína MAP 7 (*microtubule associated protein 7*). Esta proteína pertenece a la familia de proteínas MAPS que se asocian con los microtúbulos y que juegan un papel fundamental en la polimerización y estabilidad de los mismos.

Los resultados presentados en esta Tesis sobre el gen *pttg1* y los genes homólogos *pttg2* y *pttg3* confirman la multifuncionalidad de esta familia de

proteínas y su implicación en procesos celulares de gran relevancia no descritos hasta el momento. La próxima etapa será el estudio de los mecanismos de acción de estas proteínas en los procesos descritos, y determinar su implicación en patologías asociadas a los mismos.

VII. CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de PTTG1 afecta a los niveles de expresión de numerosos genes, especialmente del gen *dlk1*, que aumenta significativamente.

2. La sobreexpresión de PTTG1 inhibe la diferenciación de preadipocitos a adipocitos, y este efecto inhibitor se debe a la estabilización del mRNA *Dlk1*.

3. La expresión de PTTG1 es paralela a la expresión de *DLK1* tanto en tejidos sanos como en los tumores analizados. En muestras tumorales, la sobreexpresión de PTTG1 va asociada a niveles mayores de expresión de *DLK1* y a un menor grado de diferenciación celular. Esta correlación constituye un factor pronóstico de la agresividad del tumor.

4. PTTG1 se localiza en diferentes compartimentos celulares durante el ciclo celular y sus niveles varían a lo largo de éste. En fase G1, PTTG1 se localiza preferentemente en la cara cis del aparato de Golgi y en el núcleo; en fase S y G2 se localiza en el citosol y en el núcleo. En mitosis, PTTG1 alcanza su pico máximo y se localiza por toda la célula, no observándose asociación ni con las vesículas del Golgi ni con las cromátidas. En telofase, bien un remanente de PTTG1, bien la proteína sintetizada *de novo*, se asocia de nuevo al Golgi.

5. Existen dos genes homólogos de PTTG1 que se expresan en las líneas celulares estudiadas: PTTG2 y PTTG3. PTTG3 se localiza también en el aparato de Golgi, mientras que PTTG2 se localiza en el núcleo.

6. En mitosis, PTTG2 se asocia al huso mitótico y en telofase permanece asociado a los puentes de tubulina que conectan las células hijas.

7. La supresión de PTTG2 y PTTG3 afecta a la viabilidad celular y produce muerte celular dependiente de p53.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abdallah, B. M.; Jensen, C. H.; Gutiérrez, G.; Leslie, R. G.; Jensen, T. G.; Kassem, M. 2004. Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dlk1/ Pref-1. *J. Bone Miner. Res.* 19 (5). May 841-852.

Abrieu, A.; Kahana, J. A.; Wood, K. W.; Cleveland, D. W. 2000. CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro. *Cell* 102 (6), Sept 15, 817-826.

Abrieu, A.; Magnaghi-Jaulin, L.; Kahana, J. A.; Peter, M.; Castro, A.; Vigneron, S.; Lorca, T.; Cleveland, D. W.; Labbe, J. C. 2001. Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* 106 (1), Jul 13, 83-93.

Adams, R. R.; Carmena, M.; Earnshaw, W. C. 2001a. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol.* 11, 49-54.

Adams, R. R.; Eckley, D. M.; Vagnarelli, P.; Wheatley, S. P.; Gerloff, D. M.; Mackay, A. M.; Svingen, P. A.; Kaufmann, S. H.; Earnshaw, W. C. 2001b. Human INCENP colocalizes with the Aurora-B/AIRK2 kinase on chromosomes and is overexpressed in tumor cells. *Chromosoma* 110, 65-74.

Adams, R. R.; Maiao, H.; Earnshaw, W. C.; Carmena, M. 2001c. Essential roles of Drosophila inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignments, kinetochore disjunction and chromosome segregation. *J. Cell Biol.* 153, 865-880.

Adams, R. R.; Wheatley, S. P.; Gouldsworthy, A. M.; Kandels-Lewis, S. E.; Carmena, M.; Smythe, C.; Gerloff, D. L.; Earnshaw, W. C. 2000. INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr. Biol.* 10 (17), Sep 7, 1075-1078.

Alcasabas, A. A.; Osborn, A. J.; Bachant, J.; Hu, F.; Werler, P. J.; Bousset, K.; Furuya, K.; Diffley, J. F.; Carr, A. M.; Elledge, S. J. 2001. Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat. Cell. Biol.* 3, 958-965.

Alexandru, G.; Uhlmann, F.; Mechtler, K.; Poupart, M. A.; Nasmyth, K. 2001. Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell* 105 (4), May 18, 459-472.

Allan, V. J. 1996. Role of motor proteins in organizing the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Sem. Cell Dev. Biol.* 7, 335-342.

Allan, B. B.; Moyer, B. D.; Balch, W. E. 2000. Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* 289 (5478), Jul 21, 401-412.

- Altenberger, T.; Bilban, M.; Auer, M.; Khosp, E.; Wolfsberger, S.; Gartner, W.; Mineval, I.; Zielinski, C.; Wagner, L.; Luger, A.** 2006. Identification of DLK1 variants in pituitary- and neuroendocrine tumors. *Biochem. Biophys. Commun* 340, 995-1005.
- Amon, A.** 1997. Regulation of B-type cyclin proteolysis by Cdc28-associated kinases in budding yeast. *EMBO J.* 16 (10), May 15, 2693-2702.
- Aravind, L.; Koonin, E. V.** 2002. Classification of the caspase-hemoglobinase fold: detection of new families and implications for the origin of the eukaryotic separins. *Proteins* 46, 355-367.
- Assou, S.; Anahory, T.; Dantesco, V.; Le Carrou, T.; Pellestor, F.; Klein, B.; Reyftmann, L.; Dechaud, H.; De Vos, J.; Hamamah, S.** 2016. The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod.* Jul 21 (7), 1705-1719.
- Baker, D. J.; Jeganathan, K. B.; Cameron, J. D.; Thompson, M.; Juneja, S.; Kopecka, A.; Kumar, R.; Jenkis, R. B.; de Groen, P. C.; Roche, P.; van Deursen, J. M.** 2004. BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat. Genet.* 36, 744-749.
- Barak, Y.; Juven, I.; Haffner, R.; Oren, M.** 1993. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* 12, 461-468.
- Barket, J.; Bartkova, J.; Lukas, J.** 1996. The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 805-814.
- Barr, F. A.; Puype, M.; Vandekerckhove, J.; Warren, G.** 1997. GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae. *Cell* 91 (2), Oct 17, 253-262.
- Bates, S.; Vousden, K. H.** 1999. Mechanism of p53-mediated apoptosis. *Cell. Mol. Life. Sci.* 55, 28-37.
- Bekker-Jensen, S.; Lukas, C.; Melander, F.; Bartek, J.; Lukas, J.** 2005. Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1. *J. Cell Biol.* 170 (2), Jul 18, 201-211.
- Bembenek, J.; Yu, H.** 2001. Regulation of the anaphase-promoting complex by the dual specificity phosphatase human Cdc14a. *J. Biol. Chem.* 276 (51), Dec 21, 48237-48242.
- Benedito, R.; Duarte, A.** 2005. Expression of Dll4 during mouse embryogenesis suggests multiple developmental roles. *Gene Expr Patterns.* 5 (6) Aug 750-755.
- Bernal, J. A.; Luna, R.; Espina, Á.; Lazaro, I.; Ramos-Morales, F.; Romero, F.; Arias, C.; Silva, A.; Tortolero, M.; Pintor-Toro, J. A.** 2002. Human securin

interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. *Nat. Genet.* 32, 306-311.

Bernal, J. A.; Roche, M.*; Méndez-Vidal, C*.; Espina, Á*.; Tortolero, M.; Pintor-Toro, J. A. 2008. Proliferative potential after DNA damage and non-homologous end joining are affected by loss of securin. *Cell Death Differ* 15, 202-212.

Biggins, S.; Murray, A. W. 2001. The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev.* 15, 3118-3129.

Biggins, S.; Walczak, C. E. 2003. Captivating capture: how microtubules attach to kinetochores. *Curr. Biol.* 13, 449-460.

Bischoff, J. R.; Anderson, L.; Zhu, Y.; Mossie, K.; Ng, L.; Souza, B.; Schryver, B.; Flanagan, P.; Clairvoyant, F.; Ginther, C.; Chan, C. S.; Novotny, M.; Slamon, D. J.; Plowman, G. D. A homologue *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J.* 17, 3052-3065.

Bishop, J. D.; Schumacher, J. M. 2002. Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity. *J. Biol. Chem.* 4, 27577-27580.

Black, B. E.; Foltz, D. R.; Chakravarthy, K.; Luger, V. L.; Woods, Jr.; Cleveland, D. W. 2004. Structural determinants for generating centromeric chromatin. *Nature* 430, 578-582.

Blower, M. D.; Karpen, G. H. 2001. The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat. Cell Biol.* 3, 730-739.

Boldin, M. P.; Goncharov, T. M.; Goltsev, Y. V.; Wallach, D. 1996. Involvement of Mach, a novel Mort1-FADD-interacting protease, in Fas/APO1-anti TNF receptor induced cell death. *Cell* 85, 803-815.

Bolton, M. A.; Lan, W.; Powers, S. E.; McClelland, M. L.; Kuang, J.; Stukenberg, P. T. 2002. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 13, 3064-3077.

Brandon, E.; Gao, Y.; García-Mata, R.; Álvarez, C.; Sztul, E. 2003. Membrane targeting of p115 phosphorylation mutants and their effects on Golgi integrity and secretory traffic. *Eur J Cell Biol.* Aug; 82 (8), 411-420

Brown, J. P.; Wei, W.; Sedivy, J. M. 1997. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblast. *Science* 277, 831-834.

- Buerstedde, J. M.; Takeda, S.** 1991. Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* 67, 179-188.
- Busino, L. M.; Chiesa, M.; Draetta, G. F.; Donzelli, M.** 2004. Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene* 23, 2050-2056.
- Buvelot, S.; Tatsutani, S. Y.; Vermaak, D.; Biggins, S.** 2003. The budding yeast Ipl1/Aurora protein kinase regulates mitotic spindle disassembly. *J. Cell Biol.* 160, 329-339.
- Caelles, C.; Helmborg, A.; Karin, M.** 1994. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 370, 220-223.
- Carvalho, A.; Carmena, M.; Sambade, C.; Earnshaw, W. C.; Wheatley, S. P.** 2003. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J. Cell Sci.* 116, 2987-2998.
- Chan, T. A.; Hermeking, H.; Lengauer, C. K.; K. W.; Vogelstein, B.** 1999. 14-3-3 Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 401, 616-620.
- Chang, D. C.; Xu, N.; Luo, K. Q.** 2003. Degradation of cyclin B is required for the onset of anaphase in Mammalian cells. *J Biol Chem.* 278 (39), Sep 26, 37865-37873.
- Cheeseman, I. M.; Anderson, S.; Jwa, M.; Green, E. M.; Kang, J.; Yates, J. R.; Chan, C. S.; Drubin, D. G.; Barnes, G.** 2002. Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell* 111, 163-172.
- Chen, R. H.** 2002. BubR1 is essential for kinetochore localization of other spindle checkpoint proteins and its phosphorylation requires Mad1. *J. Cell Biol.* 158, 487-496.
- Chen, X.; Ko, L. J.; Jayaraman, L.; Prives, C.** 1996. p53 levels, functional domains and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev.* 10, 24-38.
- Chen, L.; Puri, R.; Lefkowitz, E. J.; Kakar, S. S.** 2000. Identification of the human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) family: molecular structure, expression, and chromosomal localization. *Gene* 248, 41-50.
- Chen, R. H.; Waters, J. C.; Salmon, E. D.; Murray, A. W.** 1996. Association of spindle assembly checkpoint component XMAP225 with unattached kinetochores. *Science* 274, 242-246.

- Cheng, L.; Hunke, L.; Hardy, C. F. J.** 1998. Cell cycle regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* polo-like kinase *cdc5p*. *Mol. Cell. Biol.* 18, 7360–7370.
- Chien, W.; Pei, L.** 2000. A novel binding factor facilitates nuclear translocation and transcriptional activation function of the pituitary tumor-transforming gene product. *J. Biol. Chem.* 275, 19422-19427.
- Ciofani, M.; Zuniga-Pflucker, J. C.** 2005. Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nat Immunol.* 6 (9) Sep 881-888.
- Ciosk, R.; Zachariae, W.; Michaelis, C.; Shevchenko, A.; Mann, M.; Nasmyth, K.** 1998. An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* 93, 1067-1076.
- Claxton, S.; Fruttiger, M.** 2005. Oxygen modifies artery differentiation and network morphogenesis in the retinal vasculature. *Dev Dyn.* 233 (3). Jul 822-828.
- Clem, A. L.; Hamid, T.; Kakar, S. S.** 2003. Characterization of the role of Sp1 and NF-Y in differential regulation of PTTG/ securin expression in tumor cells. *Gene* 322, Dec 11, 113-121.
- Cleveland, D. W.; Mao, Y.; Sullivan, K. F.** 2003. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 112, 407-421.
- Clurman, B. E.; Sheaff, R. J.; Thress, K.; Groudine, M.; Roberts, J. M.** 1996. Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev.* 10, 1979-1990.
- Clute, P.; Pines, J.** 1999. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat. Cell Biol.* 1, 82-87.
- Cohen-Fix, O.; Koshland, D.** 1997. The anaphase inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* is a target of the DNA damage checkpoint pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, Dec, 14361-14366.
- Cohen-Fix, O.; Koshland, D.** 1999. Pds1p of budding yeast has dual roles: inhibition of anaphase initiation and regulation of mitotic exit. *Genes Dev.* 13 (15), Aug 1, 1950-1959.
- Cohen-Fix, O.; Peters, J. M.; Kirschner, M. W.; Koshland, D.** 1996. Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev.* 10 (24), Dec 15, 3081-3093.

- Cole, N. B.; Lippincott-Schwartz, J.** 1995. Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 55-64.
- Cooke, C. A.; Shaar, B.; Yen, T. J.; Earnsha, W. C.** 1997. Localization of CENP-E in the fibrous corona and outer plate of mammalian kinetochores from prometaphase through anaphase. *Chromosoma* 106, 446-455.
- DeGregori, J.** 2002. The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochim. Biophys. Acta* 1602, 131-150.
- De La Coste, A.; Six, E.; Fazilleau, N.; Mascarell, L.; Legrand, N.; Mailhe, M. P.; Cumano, A.; Laabi, Y.; Freitas, A. A.** 2005. In vivo and in absence of a thymus, the enforced expression of the Notch ligands delta-1 or delta-4 promotes T cell development with specific unique effects. *J Immunol.* 174 (5). Mar 1, 2730-2737.
- DeLuca, J. G.; Howell, B. J.; Canman, J. C.; Hickey, J. M.; Fang, G.; Salmon, E. D.** 2003. Nuf2 and Hec1 are required for retention of the checkpoint proteins Mad1 and Mad2 to kinetochores. *Curr. Biol.* 13, 2103-2109.
- DeLuca, J. G.; Moree, B.; Hickey, J. M.; Kilmartin, J. V.; Salmon, E. D.** 2002. hNuf2 inhibition blocks stable kinetochore-microtubule attachment and induces mitotic cell death in HeLa cells. *J. Cell Biol.* 159, 549-555.
- DeMatteis, M. A.; Godi, A.; Corda, D.** 2002. Phosphoinositides and the Golgi complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 434-447.
- Den Elzen, N.; Pines, J.** 2001. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J. Cell Biol.* 153, 121-136.
- Deng, C.; Zhang, P.; Harper, J. W.; Elledge, S. J.; Leder, P.** 1995. Mice lacking p21^{CIP1/WAF1} undergo normal development but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675-684.
- Diao, A.; Frost, L.; Morohashi, Y.; Lowe, M.** 2008. Coordination of golgin tethering and SNARE assembly: GM130 binds syntaxin 5 in a p115-regulated manner. *J Biol Chem.* Mar 14, 283 (11), 6957-6967.
- Ditchfield, C.; Johson, V- L.; Tighe, A.; Ellston, R.; Haworth, C.; Johnson, T.; Mortlock, A.; Keen, N.; Taylor, S. S.** 2003. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J. Cell Biol.* 161 (2), April 28, 267-280.
- Dobles, M.; Liberal, V.; Scott, M. L.; Benezra, R.; Sorger, P. K.** 2000. Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell* 101, 635-645.
- Domínguez, A.; Ramos-Morales, F.; Romero, F.; Ríos, R. M.; Dreyfus, F.; Tortolero, M.; Pintor-Toro, J. A.** 1998. hpttg, a human homologue of rat pttg,

is overexpressed in hematopoietic neoplasms. Evidence for a transcriptional activation function of hPTTG. *Oncogene* 17, 2187-2193.

Donaldson, J. G.; Lippincott-Schwartz, J. 2000. Sorting and signalling at the Golgi complex. *Cell* 101, 693-696.

Donzelli, M.; Squatrito, M.; Ganoth, D.; Hershko, A.; Pagano, M.; Draetta, G. F. 2002. Dual mode of degradation of Cdc25A phosphatase. *EMBO J.* 21, 4875-4884.

Draviam, V. M.; Orrechia, S.; Lowe, M.; Pardi, R.; Pines, J. 2001. The localization of human cyclins B1 and B2 determines CDK1 substrate specificity and neither enzyme requires MEK to disassemble the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 152 (5), March 5, 945-958.

Dulic, V.; Lees, E.; Reed, S. I. 1992. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 257 (5078), Sep 25, 1958-1961.

Earnshaw, W. C.; Rothfield, N. 1985. Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma* 91, 313-321.

Efimov, A.; Kharitonov, A.; Efimova, N.; Loncarek, J.; Miller, P. M.; Andreyeva, N.; Gleeson, P.; Galjart, N.; Maia, A. R.; McLeod, I. X.; Yates III J. R.; Maiato, H.; Khodjakov, A.; Akhmanova, A.; Kaverina, I. 2007. Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev. Cell* 12, 917-930.

El-Deiry, W. S.; Tokino, T.; Velculescu, V. E.; Levy, D. B.; Parsons, R.; Trent, J. M.; Lin, D.; Mercer, E.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 827-835.

Espina, Á. G.; Méndez-Vidal, C.; Moreno-Mateos, M. Á.; Sáez, C.; Romero-Franco, A.; Japón, M. Á.; Pintor-Toro, J. A. 2009. Induction of Dlk1 by Pttg1 inhibits adipocyte differentiation and correlates with malignant transformation. *Mol. Biol. Cell*, Jul 20 (14), 3353-3362.

Etienne-Manneville, S. 2004. Cdc42-the centre of polarity. *Journal of Cell Science* 117, 1291-1300.

Falck, J.; Mailand, N.; Syljuasen, R. G.; Barket, J.; Lukas, J. 2001. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathways guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410, 842-847.

Falck, J.; Petrini, J. H.; Willians, B. R.; Lkas, J.; Barket, J. 2002. The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat. Genet.* 30, 290-294.

- Fang, G.** 2002. Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex. *Mol. Biol. Cell* 13, 755-766.
- Fang, G.; Yu, H.; Kirschner, M. W.** 1998a. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev.* 12, 1871-1883.
- Farr, K. A.; Cohen-Fix, O.** 1999. The metaphase to anaphase transition: a case of productive destruction. *Eur. J. Biochem.* 263, 14-19.
- Ferri, K. F.; Kroemer, G.** 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* 3, 255-263.
- Fraschini, R.; Beretta, A.; Sironi, L.; Mussachio, A.; Lucchini, G.; Piatti, S.** 2001. Bub3 interaction with Mad2, Mad3 and Cdc20 is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores.. *EMBO J.* 20, 6648-6659.
- Fukuzawa, R.; Heathcott, R. W.; Morison, I. M.; Reeve, A. E.** 2005. Imprinting, expression, and localisation of DLK1 in Wilms tumours. *J Clin Pathol.* 58 (2), Feb 145-150.
- Funabiki, H.; Yamano, H.; Kumada, K.; Nagao, K.; Hunt, T.; Yanagida, M.** 1996. Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* 381, 438-441.
- Gaetz, J.; Kapoor, T. M.** 2004. Dynein/dynactin regulate metaphase spindle length by targeting depolymerizing activities to spindle poles. *J Cell Biol.* Aug 16; 166 (4), 465-471.
- Galbiati, L.; Mendoza-Maldonado, R.; Gutierrez, M. I.; Giacca, M.** 2005. Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination. *Cell Cycle* 4 (7), Jul 25, 930-939.
- Gallant, P.; Nigg, E. A.** 1992. Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. *J. Cell Biol.* 117, 203-224.
- Garces, C.; Ruiz-Hidalgo, M. J.; Bonvini, E.; Goldstein, J.; Laborda, J.** 1999. Adipocyte differentiation is modulated by secreted delta-like (dlk) variants and requires the expression of membrana-associated dlk. *Differentiation* 64 (2). Jan, 103-114.
- Gassmann, R.; Carvalho, A.; Henzing, J.; Ruchaud, S.; Hudson, D. F.; Honda, R.; Nigg, E. A.; Gerloff, D. L.; Earnshaw, W. C.** 2004. Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 166, 179-191.
- Genkai, N.; Homma, J.; Sano, M.; Tanaka, R.; Yamanaka, R.** 2006. Increased expression of pituitary tumor-transforming gene (PTTG)-1 is

correlated with poor prognosis in glioma patients. *Oncol. Rep.* 15 (6), June, 1569-1574.

Ghiara, J. B.; Richardson, H. E.; Sugimoto, K; Henze, M.; Lew, D. J.; Wittenberg, C.; Reed, S. I. 1991. A cyclin B homolog in *S. cerevisiae*: chronic activation of the Cdc28 protein kinase by cyclin prevents exit from mitosis. *Cell* 65, 163-174.

Giaccia, A. J.; Kastan, M. B. 1998. The complexity of p53 modulation emerging patterns from divergent signals, *Genes Dev.* 12, 2973-2983.

Giet, R.; Glover, D. M. 2001. Drosophila Aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J. Cell Biol.* 152, 669-681.

Giet, R; Prigent, C. 1999. Aurora/Ipl1-related protein kinase, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J. Cell Sci.* 112, 5391-3601.

Gil-Bernabé, A. M.; Romero, F.; Limón Mortes, M. C.; Tortolero, M. 2006. Protein phosphatase 2A stabilizes human securin, whose phosphorylated forms are degraded via the SCF ubiquitin ligase. *Mol. Cell Biol.* 26 (11), June, 4017-4027.

Giménez-Abian, J. F.; Sumara, I.; Hirota, T.; Hauf, S.; Gerlich, D.; De La Torre, C.; Ellenberg, J. Peters, J. M. 2004. Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms. *Curr. Biol.* 14, 1187-1193.

Girard, F.; Fernández, A.; Lamb, N. 1995. Delayed cyclin A and B1 degradation in non-transformed mammalian cells. *J. Cell Sci.* 108, 2599-2608.

Glover, D. M.; Hagan, I. M.; Tavares, A. A. 1998. Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Dev.* 12, 3777-3787.

Glover, D. M.; Leibowitz, M. H.; Mclean, M. D.; Parry, H. 1995. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindle. *Cell* 81, 95-105.

Glotzer, M; Murray, A. W.; Kirschner, M. W. 1991. Cyclin is degraded by ubiquitin pathway. *Nature* 349, 438-441.

Goldberg, M.; Stuki, M.; Falck, J.; D'Amours, D.; Rahman, D.; Pappin, D.; Barkett, J.; Jackson, S. P. 2003. MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature* 421, Feb 27, 952-956.

Golsteyn, R. M.; Mundt, K. E.; Fry, A. M.; Nigg, E. A. 1995. Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *J. Cell Biol.* 129 (6), Jun, 1617-1628.

- Gorbsky, G. J.** 2001. The mitotic spindle checkpoint. *Curr. Biol.* 11, 1001-1004.
- Goshima, G.; Kiyomitsu, T.; Yoda, K.; Yanagida, M.** 2003. Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *J. Cell Biol.* 160, 25-39.
- Goshima, G.; Nédélec, F.; Vale, R. D.** 2005. Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins. *J Cell Biol.* Oct 24; 171(2), 229-240.
- Gottlieb, E.; Lindner, S.; Oren, M.** 1996. Relationship of sequence-specific transactivation and p53-regulated apoptosis in interleukin 3-dependent hematopoietic cells. *Cell Growth Differ.* 7, 301-310.
- Gould, K. L. and Nurse, P.** 1989. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2 protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* 342, 39-45.
- Grallert, A and Hagan, I. M.** 2002. Schizosaccharomyces pombe NIMA-related kinase, Fin1, regulates spindle formation and an affinity of Polo for the SPB. *EMBO J.* 21, 3096-3107.
- Grenon, M.; Gilbert, C.; Lowndes, N. F.** 2001. Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nat. Cell. Biol.* 3, 844-847.
- Gupta, P.B., Kuperwasser, C., Brunet, J.P., Ramaswamy, S., Kuo, W.L., Gray, J.W., Naber, S.P., and Weinberg, R.A.** 2005. The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet* 37, 1047-1054.
- Hagting, A.** 2002. Human securin proteolysis is controlled by spindle checkpoint and reveals when APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J. Cell Biol.* 157 (7), Jun 24, 1125-1237.
- Hagting, A; Karlsson, C.; Clute, P.; Jackman, M.; Pines, J.** 1998. MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J.* 17 (14), Jul 15, 4127-4138.
- Hamanaka, R.; Smith, M. R.; O'connor, P. M.; Maloid, S.; Mihalic, K.; Spivak, J. L.; Longo, D. L.; Ferris, D. K.** 1995. Polo-like kinase is a cell cycle-regulated kinase activated during mitosis. *J. Biol. Chem.* 270 (36), Sep 8, 21086-21091.
- Harper, J. W.** 2002. A phosphorylation driven ubiquitination switch for cell-cycle control. *Trends Cell Biol.* 12, 104-107.
- Harris, C. C.** 1993. p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 262, 1980-1981.

- Hardwick, K. G.; Johnston, R. C.; Smith, D. L.; Murray, A. W.** 2000. MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p. *J. Cell Biol.* 148, 871-882.
- Hauf, S.; Cole, R. W.; LaTerra, S.; Zimmer, C.; Schnapp, G.; Walter, R.; Heckel, A.; van Meel, J.; Rieder, C. L.; Peters, J. M.** 2003. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* 161, 281-294.
- Hauf, S.; Waizenegger, I. C.; Peters, J. M.** 2001. Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science* 293, 1320-1323.
- Haupt, Y.; Maya, R.; Kazaz, A.; Oren, M.** 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.
- Heaney, A. P.; Singson, R.; McCabe, C. J.; Nelson, V.; Nakashima, M.; Melmed, S.** 2000. Expression of pituitary-tumor transforming gene in colorectal tumours. *Lancet* 355, 716-719.
- Hernández, A.; López-Llunch, G.; Bernal, J. A.; Navas, P.; Pintor-Toro, J. A.** 2008. Dicoumarol down-regulates human PTTG1/Securin mRNA expression through inhibition of Hsp90. *Mol. Cancer Ther* 7 (3), 474-482.
- Hinchcliffe, E. H.; Li, C.; Thompson, E. A.; Maller, J. L.; Sluder, G.** 1999. Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science* 283 (5403), Feb 5, 770-771.
- Hirano, T.** 2000. Chromosome cohesion, condensation, and separation. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 115-144.
- Hsiao, C. C.; Huang, C. C.; Sheen, J. M.; Tai, M. H.; Chen, C. M.; Huang, L. L.; Chuang, J. H.** 2005. Differential expression of delta-like gene and protein in neuroblastoma, ganglioneuroblastoma and ganglioneuroma. *Mod Pathol.* 18 (5), May 656-662.
- Hoque, M. T.; Ishikawa, F.** 2001. Human chromatid cohesin component hRad21 is phosphorylated in M phase and associated with metaphase centromeres. *J. Biol. Chem.* 276, 5059-5067.
- Holloway, S. L.; Glotzer, M.; King, R. W.; Murray, A. W.** 1993. Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell* 73, 1393-1402.
- Honda, R.; Korner, R.; Nigg, E. A.** 2003. Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol. Biol. Cell* 14, 3325-3341.

- Honda, R.; Tanaka, H.; Yasuda, H.** 1997. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* 420, 25-27.
- Hoque, M. T.; Ishikawa, F.** 2002. Cohesin defects lead to premature sister chromatid separation, kinetochore dysfunction, and spindle-assembly checkpoint activation. *J. Biol. Chem.* 277, 42306-42314.
- Hori, T.; Haraguchi, T.; Hiraoka, Y.; Kimura, H.; Fukagawa, T.** 2003. Dynamic behavior of Nuf2-Hec1 complex that localizes to the centrosome and centromere and is essential for mitotic progression in vertebrate cells. *J. Cell Sci.* 116, 3347-3362.
- Hornig, N. C.; Knowles, P. P.; McDonald, N. Q.; Uhlmann, F.** 2002. The dual mechanism of separase regulation by securin. *Curr. Biol.* 12 (12), Jun 25, 973-982.
- Howard, J.; Hyman, A. A.** 2003. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* 422, 753-758.
- Hoyt, M. A.** 2001. A new view of the spindle checkpoint. *J. Cell Biol.* 154, 909-911.
- Hoyt, M. A.; Totis, L.; Roberts, B. T.** 1991. S. cerevisiae genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 66, 507-517.
- Hsu, J. Y.; Sun, Z. W.; Li, X.; Reuben, M.; Tatchell, K.; Bishop, D. K.; Grushcow, J. M.; Brame, C. J.; Caldwell, J. A.; Hunt, D. F.; Lin, R.; Smith, M. M.; Allis, C. D.** 2000. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 102, 279-291.
- Huang, X.; Hatcher, R.; York, P.; Zhang, P.** 2005. Securin and separase phosphorylation act redundantly to maintain sister chromatid cohesion in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell*, Jul 19.
- Huang, B.; Eberstadt, M.; Olejniczak, E. T.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W.** 1996. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* 384, 638-641.
- Hwang, L. H.; Lau, L. F.; Smith, D. L.; Mistrot, C. A.; Hardwick, K. G.; Hwang, E. S.; Amon, A.; Murray, A. W.** 1998. Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science* 279, 1041-1044.
- Israels, E. D.; Israels, L. G.** 2001. The cell cycle. *STEM CELLS* 19, 88-91.
- Iyer, N.G.; Ozdag, H.; Caldas, C.** 2004. p300/CBP and cancer. *Oncogene* 23 (24), May 24, 4225-4231.

Jackman, M.; Firth, M.; Pines, J. 1995. Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *EMBO J.* 14 (8), 1646-1654.

Jackman, M.; Lindon, C.; Nigg, E. A.; Pines, J. 2003. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat. Cell Biol.* 5, Feb, 143-148.

Jallepalli, P. V.; Lengauer, C. 2001. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat. Rev. Cancer* 1, 109-117.

Jallepali, P. V.; Waizenegger, I. C.; Bunz, F.; Langer, S.; Speicher, M. R.; Peters, J. M.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Lengauer, C. 2001. Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell* 105, 445-457.

Jaspersen, S. L.; Charles, J. F.; Morgan, D. O. 1999. Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol.* 9 (5), Mar 11, 227-236.

Jeffrey, P. D.; Russo, A. A.; Polyak, K.; Gibbs, E.; Hurwitz, J.; Massague, J.; Pavletich, N. P. 1995. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376 (6538), Jul 27, 313-320.

Jensen, S.; Segal, M.; Clarke, D. J.; Reed, S. I. 2001. A novel role of the budding yeast separin Esp1 in anaphase spindle elongation: evidence that proper spindle association of Esp1 is regulated by Pds1. *J. Cell Biol.* 152, 27-40.

Jin, P. 1996. Role of inhibitory CDC2 phosphorylation in radiation-induced G2 arrest in human cells. *J. Cell Biol.* 134, 963-970.

Jones, S. N.; Roe, A. E.; Donehower, L. A.; Bradley, A. 1995. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378, 206-208.

Jung, C-R.; Yoo, J.; Jang, Y-J.; Kim, S.; Chu, I-S.; Yeom, Y-I.; Choi, J-Y.; Im, D-S. 2006. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against PTTG1 inhibits liver cancer cell growth in vitro and in vivo. *Hepatology* 43, nº 5, 1042-1052.

Kakar, S. S. 1999. Molecular cloning, genomic organization, and identification of the promoter for the human pituitary tumor transforming gene (PTTG). *Gene* 240 (2), Nov 29, 317-324.

Kallio, M. J.; Beardmore, V. A.; Weinstein, J.; Gorbsky, G. J. 2002a. Rapid microtubule-independent dynamics of Cdc20 at kinetochores and centrosomes in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 158, 841-847.

Kallio, M. J.; McClelland, M. L.; Stukenberg, P. T.; Gorbsky, G. J. 2002. Inhibition of aurora B kinase blocks chromosome segregation, overrides the

spindle checkpoint, and perturbs microtubule dynamics in mitosis. *Curr. Biol.* 12, 900-905.

Kawamura, K.; Izumi, H.; Ma, Z.; Ikeda, R.; Moriyama, M.; Tanaka, T.; Nojima, T.; Levin, L. S.; Fujikawa-Yamamoto, K.; Suzuki, K.; Fukasawa, K. 2004. Induction of centrosome amplification and chromosome instability in human bladder cancer cells by p53 mutation and cyclin E overexpression. *Cancer Res.* 64 (14), Jul 15, 4800-4809.

Karpen, G. H.; Allshire, R. C. 1997. The case for epigenetics effects on centromere identity and function. *Trends Genet.* 13, 489-496.

Kastan, M. B.; Zhan, Q.; El-Deiry, W. S.; Carrier, F.; Jacks, T.; Walsh, W. V.; Plunkett, B. S.; Vogelstein, B.; Fornace, A. J. 1992. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia telangiectasia. *Cell* 71, 587-597.

Kastan, M. B.; Onyekwere, O.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Craig, R. W. 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51, 6304-6311.

Kellogg, D. R.; Moritz, M.; Alberts, B. M. 1994. The centrosome and cellular organization. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 639-674.

Kim, H. S.; Takahashi, M.; Matsuo, K.; Ono, Y. 2007. Recruitment of CG-NAP to the Golgi apparatus through interaction with dynein-dynactin complex. *Genes Cells* 12, 421-434.

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

King SM. 2000. The dynein microtubule motor. *Biochim Biophys Acta.* Mar 17; 1496 (1), 60-75.

King, R. W.; Deshaies, R. J.; Peters, J. M.; Kirschner, M. W. 1996. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274, 1652-1659.

Kitagawa, K.; Hieter, P. 2001. Evolutionary conservation between budding yeast and human kinetochores. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 678, 687.

Kitajima, T. S.; Hauf, S.; Ohsugi, M.; Yamamoto, T.; Watanabe, Y. 2005. Human Bub1 defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting Shugoshin localization. *Curr. Biol.* 15 (4), Feb 22, 353-359.

Kitajima, T. S.; Kawashima, S. A.; Watanabe, Y. 2004. The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* 427 (6974), Feb 5, 510-517.

Kluck, R. M.; Boissy-Wetzel, E.; Green, D. R.; Newmeyer, D. D. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.

Knudsen, K.E.; Booth, D.; Naderi, S.; Sever-Chroneos, Z.; Frigour, A. F.; Hunton, I. C.; Feramisco, J. R.; Wang, J. Y.; Knudsen, E. S. 2000. RB-dependent S-phase response to DNA damage. *Mol. Cell Biol.* 20 (20), Oct, 7751-7763.

Kochanski, R. S.; Borisy, G. G. 1990. Mode of centriole duplication and distribution. *J. Cell Biol.* 110, 1599-1605.

Kodani, A.; Kristensen, I.; Huang, L.; Sütterlin, C. 2009. GM130-dependent control of Cdc42 activity at the Golgi regulates centrosome organization. *Mol Biol Cell* 20, Feb 15, 1192-1200.

Kodani, A.; Sutterlin, C. 2008. The Golgi protein GM130 regulates centrosome morphology and function. *Mol. Biol. Cell* 19, 745-753.

Koff, A.; Giordano, A.; Desai, D.; Yamashita, K.; Harper, J. W.; Elledge, S.; Nishimoto, T.; Morgan, D. O.; Franza, B. R.; Roberts, J. M. 1992. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257 (5077), Sep 18, 1689-1694.

Kogoshi, H.; Tohda, S.; Fu, L.; Koyama, T.; Nara, N. 2005. Effect of notch ligands on in vitro sensitivity to chemo-therapeutic drugs in leukemia and lymphoma cells. *Oncol Rep.* 14 (3). Sep, 723-726.

Krek, W.; Ewen, M. E.; Shirodkar, S.; Arany, Z.; Kaelin, W. G. Jr.; Livingston, D. M. 1994. Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* 78 (1), Jul 15, 161-172.

Kumada, K.; Nakamura, T.; Nagao, K.; Funabiki, H.; Nakagawa, T.; Yanagida, M. 1998. Cut1 is loaded onto the spindle by binding to Cut2 and promotes anaphase spindle movement upon Cut2 proteolysis. *Curr. Biol.* 8, 633-641.

Kunitoku, N.; Sasayama, T.; Marumoto, T.; Zhang, D.; Honda, S.; Kobayashi, O.; Hatakeyama, K.; Ushio, Y.; Saya, H.; Hirota, T. 2003. CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev. Cell* 5, 853-864.

Kuriyama, R.; Borisy, G. G. 1981. Centriole cycle in Chinese hamster ovary cells as determined by whole-mount electron microscopy. *J. Cell Biol.* 91, 814-821.

- Laborda, J.; Sausville, E. A.; Hoffman, T.; Notario, V.** 1993. Dlk, a putative mammalian homeotic gene differentially expressed in small cell luna carcinoma and neuroendocrine tumor cell line. *J. Biol. Chem.* 268 (6), Feb 25, 3817-3820.
- Lacey, K. R.; Jackson, P. K.; Stearns, T.** 1999. Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (6), Mar 16, 2817-2822.
- Lange, B. M.** 2002. Integration of the centrosome in cell cycle control, stress response and signal transduction pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 35-43.
- Langer, F.; Stickel, J.; Tessema, M.; Kreipe, H.; Lehmann, U.** Overexpression of delta-like (Dlk) in a subset of myelodysplastic syndrome bone marrow trephines. *Leuk Res.* 28 (10). Oct 1081-1083.
- Laronga, C.; Yang, H. Y.; Neal, C.; Lee, M. H.** 2000. Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* 275, 23106-23112.
- Lee, S.; Elenbaas, B.; Levine, A. J.; Griffith, J.** 1995. p53 and its 14Kda C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* 81, 1013-1020.
- Lee, K. S.; Erikson, R. L.** 1997. Plk is a functional homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc5, and elevated Plk activity induces multiple septation structures. *Mol. Cell Biol.* 17 (6), Jun, 3408-3417.
- Lee, A. C.; Fernández-Capetillo, O.; Pisupati, V.; Jackson, S. P.; Nussenzweig, A.** 2005. Specific association of mouse MDC1/NFBD1 with NBS1 at sites of DNA-damage. *Cell Cycle* 4 (1), Jan, 177-182.
- Lens, S. M.; Wolthuis, R. M.; Klompmarker, R.; Kauw, J.; Agami, R.; Brummelkamp, T.; Kops, G.; Medema, R. H.** 2003. Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *EMBO J.* 22, 2934-2947.
- Leverson, J. D.; Huang, H.-K.; Forsburg, S. L.; Hunter, T.** 2002. The *Schizosaccharomyces pombe* aurora-related kinase Ark1 interacts with the inner centromere protein Pic1 and mediates chromosome segregation and cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 13, 1132-1143.
- Levine, A. J.** The tumor supressor genes. 1993. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 623-651.
- Levine, A. J.** 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Lewis, T. S.; Hunt, J. B.; Aveline, L. D.; Jonscher, K. R.; Louie, D. F.; Yeh, J. M.; Nahreini, T. S.; Resing, K. A.; Ahn, N. G.** 2000. Identification of novel

MAP kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry. *Mol. Cell* 6 (6), Dec, 1343-1354.

Li, D.; Yea, S.; Li, S.; Chen, Z.; Narla, G.; Banck, M.; Laborda, J.; Tan, S.; Friedman, J. M.; Friedman, S. L.; Walsh, M. J. 2005. Kruppel-like factor-6 promotes preadipocyte differentiation through histone deacetylase 3-dependent repression of DLK1. *J Biol Chem.* Jul 22; 280 (29), 26941-52.

Li, J.; Meyer, A. N.; Donoghue, D. J. 1997. Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, Jan, 502-507.

Li, M.; Zhang, P. 2009. The function of APC/C^{Cdh1} in cell cycle and beyond. *Cell division.* Review. Jan, 1-7.

Li, R.; Murray, A. W. 1991. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66 (3), Aug 9, 519-531.

Lim, H. H.; Goh, P. Y.; Surana, U. 1998. Cdc20 is essential for the cyclosome-mediated proteolysis of both Pds1 and Clb2 during M phase in budding yeast. *Curr. Biol.* 8 (4), Feb 12, 231-234.

Limón-Mortés, M. C.; Mora-Santos, M.; Espina, Á.; Pintor-Toro, J. A.; López-Román, A.; Tortolero, M.; Romero, F. 2008. UV-induced degradation of securin is mediated by SKP1-CUL1-beta TrCP E3 ubiquitin ligase. *J Cell Sci.* Jun 1; 121 (Pt 11): 1825-1831.

Lin, C. Y.; Madsen, M. L.; Yarm, F. R.; Jang, Y. J.; Liu, X.; Erikson, R. L. 2000. Peripheral Golgi protein GRASP65 is a target of mitotic polo-like kinase (Plk) and Cdc2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (23), Nov 7, 12589-12594.

Linke, S. P.; Clarkin, K. C.; DiLeonardo, A. D.; Tsou, A.; Wahl, G. M. 1996. A reversible, p53 dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev.* 10, 934-947.

Liu, F. 1997. The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and golgi complex. *Mol. Cell Biol.* 17, 571-583.

Longhese, M. P.; Clerici, M.; Lucchini, G. 2003. The S-phase checkpoint and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 532, 41-58.

Losada, A. Hirano, M. Hirano, T. 2002. Cohesion release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes Dev.* 16, 3004-3016.

Losada, A.; Hirano, M.; Hirano, T. 1998. Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* 12, 1986-1997.

- Losada, A.; Yokochi, T.; Hirano, T.** 2005. Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Sci.* 118 (Pt 10), May 15, 2133-2141.
- Lowe, M.; Rabouille, C.; Nakamura, N.; Watson, R.; Jackman, M.; Jamsa, E.; Rahman, D.; Pappin, D. J.; Warren, J.** 1998. Cdc2 kinase directly phosphorylates the cis-Golgi matrix protein GM130 and is required for Golgi fragmentation in mitosis. *Cell* 94 (6), Sep 18, 783-793.
- Luca, F. C.; Shibuya, E. K.; Dhormann, C. E.; Ruderman, J. V.** 1991. Both cyclin A delta 60 and B delta 97 are stable and arrest cells in M-phase, but only cyclin B delta 97 turns on cyclin destruction. *EMBO J.* 10 (13), Dec, 4311-4320.
- Luo, X.; Tang, Z.; Rizo, J.; Yu, H.** 2002. The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20. *Mol. Cell* 9 (1), Jan, 59-71.
- Luo, J. H.; Ren, B.; Keryanov, S.; Tseng, G. C.; Rao, U. N.; Monga, S. P.; Strom, S.; Demetris, A. J.; Nalesnik, M.; Yu, Y. P.; Ranganathan, S.; Michalopoulos, G. K.** 2006. Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Hepatology* 44, 1012-1024.
- Mailand, N.; Falck, J.; Lukas, C.; Syljuasen, R. G.; Welcker, M.; Bartek, J.; Lukas, J.** 2000. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* 288, 1425-1429.
- Malumbres, M.; Barbacid, M.** 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 222-231.
- Malumbres, M.; Ortega, S.; Barbacid, M.** 2000. Genetic analysis of mammalian cyclin-dependent kinases and their inhibitors. *Biol. Chem.* 381(9/10), Sept/Oct, 827-838. Review.
- Malumbres, M.; Sotillo, R.; Santamaría, D.; Galán, J.; Cerezo, A.; Ortega, S.; Dubus, P.; Barbacid, M.** 2004. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118 (4), Aug 20, 493-504.
- Manilay, J. O.; Anderson, A. C.; Kang, C.; Robey, E. A.** 2005. Impairment of thymocyte development by dominant-negative Kuzbanian (ADAM-10) is rescued by the Notch ligand, delta-1. *J Immunol.* 174 (11). Jun 1, 6732-6741.
- Mao, Y.; Abrieu, A.; Cleveland, D. W.** 2003. Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell* 114 (1), Jul 11, 87-98.

- Marston, A. L.; Tham, W. H.; Shan, H.; Amon, A.** 2004. A genome-wide screen identifies genes required for centromeric cohesion. *Science* 303, 1367-1370.
- Martinsson, H. S.; Starborg, M.; Erlandsson, F.; Zetterberg, A.** 2005. Single cell analysis of G1 check points-the relationship between the restriction point and phosphorylation of pRb. *Exp Cell Res.* 305 (2), May 1, 383-391.
- Massagué, J.; Polyak, K.** 1995. Mammalian antiproliferative signals and their targets, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 91-96.
- Matsumoto, Y.; Hayashi, K.; Nishida, E.** 1999. Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.* 9 (8), Apr 22, 429-432.
- Matsumoto, Y.; Maller, J. L.** 2004. A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry. *Science* 306 (5697), Oct 29, 885-888.
- Mayor, T.; Meraldi, P.; Stierhof, Y. D.; Nigg, E. A.; Fry, A. M.** 1999. Protein kinases in control of the centrosome cycle. *FEBS Lett.* 452, 92-95.
- McAinsh, A. D.; Tytell, J. D.; Sorger, P. K.** 2003. Structure, function, and regulation of budding yeast kinetochores. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 519-539.
- McCabe, C. J.; Boelaert, K.; Tannahill, N. A.; Heaney, A. P.; Stratford, A. L.; Khaira, J. S.; Hussain, S.; Sheppard, M. C.; Franklyn, J. A.; Gittoes, N. J. L.** 2002. Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/ Flk-1 and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. *J. Clin. Endocr. Metab.* 87 (9), 4238-4244.
- McDonald, H. B.; Byers, B.** 1997. A proteasome cap subunit required for spindle pole body duplication in yeast. *J. Cell Biol.* 137 (3), May 5, 539-553.
- McGrew, J. T.; Goetsch, L.; Byers, B.; Baum, P.** 1992. Requirement for ESP1 in the nuclear division of *Sacharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 3, 1443-1454.
- McGuinness, B. E.; Hirota, T.; Kudo, N. R.; Peters, J. M.; Nasmyth, K.** 2005. Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol.* 3 (3), Mar, e86, 0344-0361.
- Mei, J.; Huang, X.; Zhang, P.** 2001. Securin is not required for cellular viability, but is required for normal growth of mouse embryonic fibroblasts. *Curr. Biol.* 11 (15), Aug 7, 1197-1201.

Meluh, P. B.; Strunnikov, A. V. 2002. Beyond the ABCs of CKC and SCC. Do centromeres orchestrate sister chromatid cohesion or vice versa? *Eur. J. Biochem.* 269, 2300-2314.

Michaelis, C.; Ciosk, R.; Nasmyth, K. 1997. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sisters chromatids. *Cell* 91 (1), Oct 3, 35-45.

Michel, L.; Díaz-Rodríguez, E.; Narayan, G.; Hernando, E.; Murty, V. V.; Benezra, R. 2004. Complete loss of the tumor supressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 4459-4464.

Millband, D. N.; Campbell, L.; Hardwick, K. G. 2002. The awesome power of multiple model systems: interpreting the complex nature of spindle checkpoint signaling. *Trens Cell Biol.* 12 (5), May, 205-209.

Millband, D. N.; Hardwick, K. G. 2002. Fission yeast Mad3p is required for Mad2p to inhibit the anaphase-promoting complex and localizes to kinetochores in a Bub1p-, Bub3p-, and Mph1p-dependent manner. *Mol. Cell Biol.* 22 (8), Apr, 2728-2742.

Minematsu, T.; Egashira, N.; Kajiya, H.; Takei, M.; Takekoshi, S.; Itoh, Y.; Tsukamoto, H.; Itoh, J.; Sanno, N.; Teramoto, A.; Osamura, R. Y. 2007. PTTG is a secretory protein in human pituitary adenomas and in mouse pituitary tumor cell lines. *Endocr. Pathol.* 18, 8-15.

Miura, K.; Jacques, K. M.; Stauffer, S.; Kubosaki, A.; Zhu, K.; Hirsch, D. S.; Resau, J.; Zheng, Y.; Randazzo, P. A. 2002. ARAP1: a point of convergence for Arf and Rho signaling. *Mol. Cell* 9, 109-119.

Miyakawa, K.; Hatsuzawa, K.; Kurokawa, T.; Asada, M.; Kuroiwa, T.; Imamura, T. 1999. A hydrophobic region locating al the center of fibroblast growth factor-9 is crucial for its secretion. *J. Biol. Chem.* 274, 29352-29357.

Miyakawa, K.; Imamura, T. 2003. Secretion of FGF-16 requires an uncleaved bipartite signal sequence. *J. Biol. Chem.* 278, 35718-35724.

Moon, Y.S., Smas, C.M., Lee, K., Villena, J.A., Kim, K.H., Yun, E.J., and Sul, H.S. 2002. Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol* 22, 5585-5592.

Moore, D. P.; Page, A. W.; Tang, T. T.; Kerrebrock, A. W.; Orr-Weaver, T. L. 1998. The cohesion protein MEIS-S332 localizes to condensed meiotic and mitotic centromeres until sister chromatids separate. *J. Cell Biol.* 140, 1003-1012.

Moore, K. A.; Pytowski, B.; Witte, L.; Hicklin, D.; Lemischka, I. R. 1997. Hematopoietic activity of a stromal cell transmembrane protein containing

epidermal growth factor-like repeat motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4011-4016.

Morgan, D. O. 1999. Regulation of the APC and exit from mitosis. *Nat. Cell Biol.* 1, E47-E53.

Müller, M.; Wilder, S.; Bannasch, D.; Israeli, D.; Lehlbach, K.; Li-Weber, M.; Friedman, S. L.; Galle, P. R.; Stremmel, W.; Oren, M.; Krammer, P. H. 1998. p53 activates the CD95 (Apo-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J. Exp. Med.* 188, 2033-2045.

Murata-Hori, M.; Tatsuka, M.; Wang, Y.-L. 2002. Probing the dynamics and functions of Aurora B kinase in living cells during mitosis and cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 13, April, 1099-1108.

Murata-Hori, M.; Wang, Y. 2002. The kinase activity of Aurora B is required for kinetochore-microtubule interactions during mitosis. *Curr. Biol.* 12, 894-899.

Murata-Ohsawa, M.; Tohda, S.; Kogoshi, H.; Sakano, S.; Nara, N. 2005. The Notch ligand, Delta-1, alters retinoic acid (RA)-induced neutrophilic differentiation into monocytic and reduces RA-induced apoptosis in NB4 cells. *Leuk Res.* 29(2). Feb 197-203.

Murray, A. W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-234.

Murray, A. W.; Solomon, M. J.; Kirschner, M. W. 1989. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* 339 (6222); May 25, 280-286.

Musacchio, A.; Hardwick, K. G. 2002. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 731-741.

Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88 (3), Feb 7, 355-365.

Nasmyth, K. 2002. Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 297 (5581), Jul 26, 559-565.

Nasmyth, K.; Peters, J. M.; Uhlmann, F. 2000. Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science* 288, 1379-1385.

Nigg, E.A. 1998. Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 776-783.

Nishihashi, A.; Haraguchi, T.; Hiraoka, Y.; Ikemura, T.; Regnier, V.; Dodson, H.; Earnshaw, W. C.; Fukagawa, T. 2002. CENP-I is essential for centromere function in vertebrate cells. *Dev. Cell* 2, 463-476.

- Nishimura, T.; Takahashi, M.; Kim, H. S.; Mukai, H.; Ono, Y.** 2005. Centrosome-targeting region of CG-NAP causes centrosome amplification by recruiting cyclin E-cdk2 complex. *Genes Cells* 10(1), Jan, 75-86.
- Nobes, C. D.; Hall, A.** 1999. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J. Cell Biol.* 144, 1235-1244.
- Nobta, M.; Tsukazaki, T.; Shibata, Y.; Xin, C.; Moriishi, T.; Sakano, S.; Shindo, H.; Yamaguchi, A.** 2005. Critical regulation of bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation by Delta1/Jagged1-activated Notch1 signaling. *J Biol Chem.* 280 (16). April 22,15842-15848. Epub 2005 Feb 4.
- Norbury, C. and Nurse, P.** 1992. Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 441-470.
- Nurse, P.** 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344, 503-507.
- Nyberg, K. A.; Michelson, R. J.; Putnam, C. W.; Weinert, T. A.** 2002. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu. Rev. Genet.* 36, 617-656.
- Oda, K.; Arakawa, H.; Tanaka, T.; Matsuda, K.; Tanikawa, C.; Mori, T.; Nishimori, H.; Tamai, K.; Tokino, T.; Nakamura, Y.; Taya, Y.** 2000. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102, 849-62.
- Oda, E.; Ohki, R.; Murasawa, H.; Nemoto, J.; Shibue, T.; Yamashita, T.; Tokino, T.; Taniguchi, T.; Tanaka, N.** 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.
- Ohki, R.; Nemoto, J.; Murasawa, H.; Oda, E.; Inazawa, J.; Tanaka, N.; Taniguchi, T.** 2000. Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J. Biol. Chem.* 275, 22627-22630.
- Ohtoshi, A.; Maeda, T.; Higashi, H.; Ashizawa, S.; Hatakeyama, M.** 2000. Human p55(CDC)/Cdc20 associates with cyclin A and is phosphorylated by the cyclin A-Cdk2 complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 530-534.
- Ohtsubo, M.; Roberts, J. M.** 1993. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblast. *Science* 259, 1908-1912.
- Ohtsubo, M.; Theodoras, A. M.; Schumager, J.; Roberts, J. M.; Pagano, M.** 1995. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell Biol.* 15, 2612-2624.
- Okuda M.** 2002. The role of nucleophosmin in centrosome duplication. *Oncogene* 21 (40), Sep 9, 6170-6174.

Okuda, M.; Horn, H. F.; Tarapore, P.; Tokuyama, Y.; Smulian, A. G.; Chan, P. K.; Knudsen, E. S.; Hofmann, I. A.; Snyder, J. D.; Bove, K. E.; Fukasawa, K. 2000. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 103(1), Sep 29, 127-140.

Osborn, A. J.; Elledge, S. J. 2003. Mrc1 is a replication fork component whose phosphorylation in response to DNA replication stress activates Rad53. *Genes Dev.* 17, 1755-1767.

Palazzo, A. F.; Joseph, H. L.; Chen, Y. J.; Dujardin, D. L.; Alberts, A. S.; Pfister, K. K.; Vallee, R. B.; Gundersen, G. G. 2001. Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr. Opin.* 11, 1536-1541.

Pardee, A. B. 1989. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246, 603-608.

Parry, D. H.; O'Farrell, P. H. 2001. The schedule of destruction of three mitotic cyclins can dictate the timing of events during exit from mitosis. *Curr. Biol.* 11 (9), May 1, 671-683.

Pei L. 2000. Activation of mitogen-activated protein kinase cascade regulates pituitary tumor-transforming gene transactivation function. *J. Biol. Chem.* 275 (40), Oct 6, 31191-31198.

Pei L. 1998. Genomic organization and identification of an enhancer element containing binding sites for multiple proteins in rat pituitary tumor-transforming gene. *J. Biol. Chem.* 273 (9), Feb 27, 5219-5225.

Pei, L. 2001. Identification of c-myc as a down-stream target for pituitary tumor transforming gene. *J. Biol. Chem.* 276, 8484-8491.

Pei, L.; Melmed, S. 1997. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol. Endocrinol.* 11, 433-441.

Peng, A.; Chen, P. L. 2005. NFBD1/Mdc1 mediates ATR-dependent DNA damage response. *Cancer Res.* 65 (4), Feb 15, 1158-1163.

Peter, M.; Le Peuch, C.; Labbe, J. C.; Meyer, A. N.; Donoghue, D. J.; Doree, M. 2002. Initial activation of cyclin-B1-cdc2 kinase requires phosphorylation of cyclin B1. *EMBO Reports* 3 (6), Jun, 551-556.

Peters, J. M. 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* 9, 931-943.

Peters, J. M. 1998. SCF and APC: the ying and yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 759-76.

- Petersen, J.; Hagan, I. M.** 2003. S. pombe aurora kinase/survivin is required for chromosome condensation and the spindle checkpoint attachment response. *Curr. Biol.* 13 (7), Apr 1, 590-597.
- Pfleger, C. M.; Kirschner, M. W.** 2000. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* 14 (6), Mar 15, 655-665.
- Pfleghaar, K.; Heubes, S.; Cox, J.; Stemmann, O.; Speicher, M. R.** 2005. Securin is not required for chromosomal stability in human cells. *PLoS Biol.* Dec; 3(12): e416.
- Piekorz, R. P.; Hoffmeyer, A.; Duntsch, C. D.; Mckay, C.; Nakajima, H.; Sexl, V.; Snyder, L.; Rehg, J.; Inle, J. N.** 2002. The centrosomal protein TACC3 is essential for hematopoietic stem cell function and genetically interfaces with p53-regulates apoptosis. *EMBO J.* 21, 653-664.
- Preisinger, C.; Korner, R.; Wind, M.; Lehmann, W. D.; Kopajtich, R.; Barr, F. A.** 2005. Plk1 docking to GRASP65 phosphorylated by Cdk1 suggests a mechanism for Golgi checkpoint signalling. *EMBO J.* 24 (4), Feb 23, 753-765.
- Prezant, T. R.; Kadioglu, P.; Melmed, S.** 1999. An intronless homolog of human proto-oncogene hPTTG is expressed in pituitary tumors: evidence for hPTTG family. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (3), Mar, 1149-1152.
- Propst, F.; Rosenberg, M. P.; Oskarsson, M. K.; Russell, L. B.; Nguyen-Huu, M. C.; Nadeau, J.; Copeland, N. G.; Vande Woude, G. F.** 1988. Genetic analysis and developmental regulation of testis-specific RNA expression of Mos, Abl, actin and Hox-1.4. *Oncogene* 2 (3), Mar, 227-233.
- Puri, R.; Tousson, A.; Chen, L.; Kakar, S. S.** 2001. Molecular cloning of pituitary tumor transforming gene 1 from ovarian tumors and its expression in tumors. *Cancer Lett.* 163, 131-139.
- Quatela, S. E.; Philips, M. R.** 2006. Ras signaling on the Golgi. *Curr Opin Cell Biol.* Apr; 18 (2), 62-167.
- Raghunandan, R.; Ruiz-Hidalgo, M.; Jia, Y.; Ettinger, R.; Rudikoff, E.; Riggins, P.; Farnsworth, R.; Tesfaye, A.; Laborda, J.; Bauer, S. R.** 2008. Dlk1 influences differentiation and function of B lymphocytes. *Stem Cells Dev.* 17 (3), 495-507.
- Ramawamy, S.; Ross, K. N.; Lander, E. S.; Golub, T. R.** 2003. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat. Genet.* 33, 49-54.
- Ramos-Morales, F.; Domínguez, Á.; Romero, F.; Luna, R.; Multon, M. C.; Pintor-Toro, J. A.; Tortolero, M.** 2000. Cell cycle regulated expression and phosphorylation of hpttg proto-oncogene product. *Oncogene* 19, 403-409.

- Régnier, V.; Vagnarelli, P.; Fukagawa, T.; Zerja, T.; Burns, E.; Trouche, D.; Earnshaw, W.; Brown, W.** 2005. CENP-A is required for accurate chromosome segregation and sustained kinetochore association of BubR1. *Mol. Cell. Biol.* 25 (10), May, 3967-3981.
- Rieder, C. L.; Cole, R. W.; Khodjakov, A.; Sluder, G.** 1995. The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J. Cell Biol.* 130 (4), Aug, 941-948.
- Ríos, R. M.; Bornens, M.** 2003. The Golgi apparatus at the cell centre. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 60-66.
- Ríos, R. M.; Sanchís, A.; Tassin, A. M.; Fedriani, C.; Bornens, M.** 2004. GMAP-210 recruits gamma-tubulin complexes to cis-Golgi membranes and is required for Golgi ribbon formation. *Cell* 118, 323-335.
- Rivero, S.; Cárdenas, J.; Bornens, M.; Ríos, R. M.** 2009. Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *The EMBO Journal* 28, 1016-1028.
- Robles, A. I.; Bemmels, N. A.; Foraker, A. B.; Harris, C. C.** 2001. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res.* 61 (18), Sep 15, 6660-6664.
- Roghi, C.; Giet, R.; Uzbekov, R.; Morin, N.; Chartrain, I.; Le Guellec, R.; Anne Couturier, A.; Doree, M.; Philippe, M.; Prigent, C.** 1998. The *Xenopus* protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly. *J. Cell Sci.* 111, 557-572.
- Roemer, K.** 1999. Mutant p53: Gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol. Chem.* 380, 879-887.
- Romero, F.; Gil-Bernabé, A. M.; Sáez, C.; Japón, M. Á.; Pintor-Toro, J. A.; Tortolero, M.** 2004. Securin is a target of the UV response pathway in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 24 (7), Apr, 2720-2733.
- Romero, F.; Multon, M. C.; Ramos-Morales, F.; Domínguez, A.; Bernal, J. A.; Pintor-Toro J. A.; Tortolero, M.** 2001. Human securin, hPTTG, is associated with Ku heterodimer, the regulatory subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Nucleic Acids Res.* 29 (6), Mar 15, 1300-1307.
- Rouse, J.; Jackson, S. P.** 2002. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* 297, 547-551.
- Ruiz-Hidalgo, M. J.; Gubina, E.; Tull, L.; Baladron, V.; Laborda, J.** 2002. Dlk modulates mitogen-activated protein kinase signalling to allow or prevent differentiation. *Exp. Cell Res.* 274 (2), 178-188.

Sáez, C.; Japón, M. A.; Ramos-Morales, F.; Romero, F.; Segura, D. I.; Tortolero, M.; Pintor-Toro, J. A. 1999. hpttg is over-expressed in pituitary adenomas and other primary epithelial neoplasias. *Oncogene* 18 (39), Sep 23, 5473-5476.

Sáez, C.; Pereda, T.; Borrero, J. J.; Espina, Á.; Romero, F.; Tortolero, M.; Pintor-Toro, J. A.; Segura, D. I.; Japón, M. A. 2002. Expression of hpttg proto-oncogene in lymphoid neoplasias. *Oncogene* 21 (53), Nov 21, 8173-8177.

Salic, A.; Waters, J. C.; Mitchison, T. J. 2004. Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. *Cell* 118 (5), Sep 3, 567-578.

Samuels-Lev, Y.; O'Connor, D. J.; Bergamaschi, D.; Trigiante, G.; Hsieh, J. K.; Zhong, S.; Campargue, I.; Naumovski, L.; Crook, T.; Lu, X. 2001. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol. Cell.* 8, 781-794.

Sánchez, Y.; Bachant, J.; Wang, H.; Hu, F.; Liu, D.; Tetzlaff, M.; Elledge, S. J. 1999. Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* 286, 1166-1171.

Scanlan, M. J.; Gout, I.; Gordon, C. M.; Williamson, B.; Stockert, E.; Gure, O.; Jager, D.; Chen, Y. T.; Mackay, A.; O'Hare, M. J.; Old, L. J. 2001. Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression. *Cancer Immun.* 1, 4.

Schmidt, P. H.; Dransfield, D. T.; Claudio, J. O.; Hawley, R. G., Trotter, K. W.; Milgram, S. L.; Goldrenring, J. R. 1999. AKAP350, a multiple spliced protein kinase A-anchoring protein associated with centrosomes. *J. Biol. Chem.* 274, 3055-3066.

Schroer, T. A. 2004. Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 759-779.

Schulze-Osthoff, K. 1994. The Fas/APO1 receptor and its deadly ligand. *Trends Cell Biology* 4, 421-426.

Serrano, M.; Lee, H.-W.; Chin, L.; Cordon-Cardo, C.; Beach, D.; De-Pinho, R. A. 1996. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 85, 27-37.

Shah, J. V.; Cleveland, D. W. 2000. Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell* 103 (7), Dec 22, 997-1000.

Sharp, D. J.; Rogers, G. C.; Scholey, J. M. 2000. Cytoplasmic dynein is required for poleward chromosome movement during mitosis in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol.* Dec; 2(12), 922-930.

- Shaw, P.; Bovey, R.; Tardy, S.; Sahli, R.; Sordat, R.; Costa, J.** 1992. Induction of apoptosis by wild type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 4495-4499.
- Sheaff, R.; Groudine, M.; Gordon, M.; Roberts, J.; Clurman, B.** 1997. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev.* 11, 1464-1478.
- Sherr, C. J.; Roberts, J. M.** 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501-1512.
- Shiloh, I.** 2001. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11(1), Feb, 71-77. Review.
- Siede, W.; Allen, J. B.; Elledge, S. J.; Friedberg, E. C.** 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* MEC1 gene, which encodes a homolog of the human ATM gene product, is required for G1 arrest following radiation treatment. *J. Bacteriol.* 178, 5841-5843.
- Sionov, R. V.; Haupt, Y.** 1999. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 18, 6145-6157.
- Sironi, L.; Mapelli, M.; Knapp, S.; Antoni, A. D.; Jeang, K. T.; Musacchio, A.** 2002. Crystal structure of the tetrameric Mad1-Mad2 core complex: implications of a 'safety belt' binding mechanism for the spindle checkpoint. *EMBO J.* 21 (10), May 15, 2496-2506.
- Smits, V. A.; Klompaker, R.; Arnaud, L.; Rijksen, G.; Nigg, E. A.; Medema, R. H.** 2000. Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat Cell Biol.* 2 (9), Sep, 672-676.
- Small, M.** 2005. Isolation of adult murine thymic stromal cells that naturally express Notch ligands. *Histochem Cell Biol.* 123 (4-5). June 513-516.
- Smas, C. M.; Sul, H. S.** 1993. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 73, 725-734.
- Solbach, C.; Roller, M.; Fellbaum, C.; Nicoletti, M.; Kaufmann, M.** 2004. PTTG mRNA expression in primary breast cancer: a prognostic marker for lymph node invasion and tumor recurrence. *Breast* 13 (1), Feb, 80-81.
- Sorensen, C. S.; Lukas, C.; Kramer, E. R.; Peters, J. M.; Barkett, J.; Lukas, J.** 2001. A conserved cyclin-binding domain determines functional interplay between anaphase-promoting complex-Cdh1 and cyclin A-Cdk2 during cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* 21 (11), Jun, 3692-3703.
- Sorensen, C. S.; Lukas, C.; Kramer, E. R.; Peters, J. M.; Barkett, J.; Lukas, J.** 2000. Nonperiodic activity of the human anaphase-promoting complex-Cdh1 ubiquitin ligase results in continuous DNA synthesis uncoupled from mitosis. *Mol. Cell Biol.* 20 (20), Oct, 7613-7623.

- Soussi, T.; Bérout, C.** 2001. Assessing TP53 status in human tumors to evaluate clinical outcome. *Nature Review Cancer* 1, 233-240.
- Soussi, T.; Dehouche, K.; Bérout, C.** 2000. p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and cancerogenesis. *Hum. Mutat.* 15, 105-113.
- Stemmann, O.; Zou, H.; Gerber, S. A.; Gygi, S. P.; Kirschner, M. W.** 2001. Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* 107, 715-726.
- Stucke, V. M.; Sillje, H. H.; Arnaud, L.; Nigg, E. A.** 2002. Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *EMBO J.* 21 (7), Apr 2, 1723-1732.
- Su, L. ; Pertz, O. ; Mikawa, M. ; Hahn, K. ; Parson, S. J.** 2008. p190RhoGAP negatively regulates Rho activity at the cleavage furrow of mitotic cells. *Exp. Cell Res.* 315, 1347-1359.
- Sudakin, V.; Chan, G. K; Yen, T. J.** 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2.J. *Cell Biol.* 154 (5), Sep 3, 925-936.
- Sugata, N.; Munekata, E.; Todokoro, T.** 1999. Characterization of a novel kinetochore protein, CENP-H. *J. Biol. Chem.* 274, 27343-27346.
- Sullivan, K. F.** 2001. A solid foundation: functional specialization of centromeric chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 182-188.
- Sumara, I.; Vorlaufer, E.; Stukenberg, P. T.; Kelm, O.; Redemann, N.; Nigg, E. A.; Peters, J. M.** 2002. The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol. Cell* 9, 515-525.
- Surana, U.; Amon, A.; Dowzer, C.; McGrew, J.; Byers, B.; Nasmyth, K.** 1993. Destruction of the CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase to anaphase transition in budding yeast. *EMBO J.* 12 (5), May, 1969-1978.
- Sütterlin, C.; Hsu, P.; Mallabiabarrena, A.; Malhotra, V.** 2002. Fragmentation and dispersal of the pericentriolar Golgi complex is required for entry into mitosis in mammalian cells. *Cell* 109, 359-369.
- Sweeney FD, Yang F, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Durocher D.** 2005. *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Curr. Biol.* 15 (15), Aug 9, 1364-1375.
- Taghon TN, David ES, Zuniga-Pflucker JC, Rothenberg EV.** 2005. Delayed, asynchronous, and reversible T-lineage specification induced by Notch/Delta signaling. *Genes Dev.* 19(8). April 15, 965-978.

Takahashi, M.; Shibata, H.; Shimakawa, M.; Miyamoto, M.; Mukai, H.; Ono, Y. 1999. Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signalling enzymes to centrosome and the GA. *J. Biol. Chem.* 274, 17267-17274.

Tanaka, T. U. ; Rachidi, N. ; Janke, C. ; Pereira, G. ; Galova, M. ; Schiebel, E. ; Stark, M. J. ; Nasmyth, K. 2002. Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell* 108 (3), Feb 8, 317-329.

Tang, Z.; Bharadwaj, R.; Li, B.; Yu, H. 2001. Mad2-Independent inhibition of APC/Cdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev. Cell* 1(2), Aug, 227-237.

Tang, Z. ; Hongjun, S. ; Wei, Q. ; Nadir, A. M. ; Mumby, M. C. ; Yu, H. 2006. PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Development Cell* 10, May, 575-585.

Tarapore, P.; Horn, H. F.; Tokuyama, Y.; Fukasawa, K. 2001. Direct regulation of the centrosome duplication cycle by the p53-p21Waf1/Cip1 pathway. *Oncogene* 20 (25), May 31, 3173-3184.

Tarapore, P.; Okuda, M.; Fukasawa, K. 2002. A mammalian in vitro centriole duplication system: evidence for involvement of CDK2/cyclin E and nucleophosmin/B23 in centrosome duplication. *Cell Cycle* 1 (1), Jan, 75-81.

Tatsuka, M.; Katayama, H.; Ota, T.; Tanaka, T.; Odashima, S.; Suzuki, F.; Taylor, S. S.; McKeon, F. 1997. Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell* 89 (5), May 30, 727-735.

Taylor, S. S.; Ha, E.; McKeon, F. 1998. The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J. Cell Biol.* 142 (1), Jul 13, 1-11.

Terada, Y. 1998. Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of aurora- and Ipl1-like midbody associated protein mitotic kinase in human cancer cells. *Cancer Res.* 58, 4811-4816.

Tishler, R. B.; Calderwood, S. K.; Coleman, C. N.; Price, B. D. 1993. Increases in sequence specific DNA binding by p53 following treatment with chemotherapeutic and DNA damaging agents. *Cancer Res.* 53, 2212-2216.

Tomonaga, T.; Nagao, K.; Kawasaki, Y.; Furuya, K.; Murakami, A.; Morishita, J.; Yuasa, T.; Sutani, T.; Kearsley, S. E.; Uhlmann, F. 2000. Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes Dev.* 14, 2757-2770.

- Tong, Y. ; Eigler, T.** 2009. Transcriptional targets for pituitary tumor-transforming gene-1. *J Mol Endocrinol.* Nov 43 (5),179-185.
- Tong, Y. ; Tan, Y. ; Zhou, C. ; Melmed, S.** 2007. Pituitary tumor transforming gene interacts with Sp1 to modulate G1/S cell phase transition. *Oncogene.*
- Topczewska, J.M., Postovit, L.M., Margaryan, N.V., Sam, A., Hess, A.R., Wheaton, W.W., Nickoloff, B.J., Topczewski, J., and Hendrix, M.J.** 2006. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nat Med* 12, 925-932.
- Toth, A.; Ciosk, R.; Uhlmann, F.; Galova, M.; Schleiffer, A.; Nasmyth, K.** 1999. Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev.* 13, 320-333.
- Toyoshima F, Moriguchi T, Wada A, Fukuda M, Nishida E.** 1998. Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *EMBO J.* 17 (10), May 15, 2728-2735.
- Tsukamoto N, Itoi M, Nishikawa M, Amagai T.** 2005. Lack of Delta like 1 and 4 expressions in nude thymus anlagen. *Cell Immunol.* 234 (2). April 77-80.
- Tugendreich, S.; Tomkiel, J.; Earnshaw, W.; Hieter, P.** 1995. CDC27Hs colocalizes with CDC16Hs to the centrosome and mitotic spindle and is essential for the metaphase to anaphase transition. *Cell* 81 (2), Apr 21, 261-8.
- Ubersax, J. A.; Woodbury, E. L.; Quang, P. N.; Paraz, M.; Blethrow, J. D.; Shah, K; Shokat, K. M.; Morgan, D. O.** 2003. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425, Oct 23, 859-864.
- Uhlmann, F.; Lottspeich, F.; Nasmyth, K.** 1999. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400 (6739), Jul 1, 37-42.
- Uhlmann, F.; Wernic, D.; Poupart, M. A.; Koonin, E. V.; Nasmyth, K.** 2000. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* 103, 375-386.
- Uzawa, S.; Samejima, I.; Hirano, T.; Tanaka, K.; Yanagida, M.** 1990. The fission yeast cut1+ gene regulates spindle pole body duplication and has homology to the budding yeast ESP1 gene. *Cell* 62, 913-925.
- Visintin, R.; Craig, K.; Hwang, E. S.; Prinz, S.; Tyers, M.; Amon, A.** 1998. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol. Cell* 2, 709-718.

- Visintin, R.; Prinz, S.; Amon, A.** 1997. CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science*. 278 (5337), Oct 17, 460-463.
- Vogelstein, B.; Lane, D.; Levine, A. J.** 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408 (6810), Nov 16, 307-310.
- Vorozhko, V. V.; Emanuele, M. J.; Kallio, M. J.; Stukenberg, P. T.; Gorbsky, G. J.** 2008. Multiple mechanisms of chromosome movement in vertebrate cells mediated through the Ndc80 complex and dynein/dynactin. *Chromosoma* Apr; 117(2), 169-179.
- Waizenegger, I. C.; Gimenez-Abian, J. F.; Wernic, D.; Peters, J. M.** 2002. Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Curr. Biol.* 12, 1368-1378.
- Waizenegger, I. C.; Hauf, S.; Meinke, A.; Peters, J.M.** 2000. Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 103, 399-410.
- Wang, B.; Matsuoka, S.; Carpenter, P. B.; Elledge, S. J.** 2002. 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* 298, 1435-1438.
- Wasch, R.; Cross, F. R.** 2002. APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature* 418 (6897), Aug 1, 556-562.
- Wassmann, K.; Benezra, R.** 1998. Mad2 transiently associates with an APC/p55Cdc complex during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (19), Sep 15, 11193-11198.
- Waters, J. C.; Chen, R. H.; Murray, A. W.; Salmon, E. D.** 1998. Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *J. Cell Biol.* 141, 1181-1191.
- Weinberg, R. A.** 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- Weinert, T. A.; Hartwell, L. H.** 1988. The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 241, 317-322.
- Weinert, T. A.; Kiser, G. L.; Hartwell, L. H.** 1994. Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev.* 8, 652-665.
- Weitzer, S.; Lehane, C.; Uhlmann, F.** 2003. A model for ATP hydrolysis-dependent binding of cohesin to DNA. *Current Biology* 13, November 11, 1930-1940.

- Westermann, S.; Cheeseman, I. M.; Anderson, S.; Yates III, J. R.; Drubin, D. G.; Barnes, G.** 2003. Architecture of the budding yeast kinetochore reveals a conserved molecular core. *J. Cell Biol.* 163, 215-222.
- Wheatley, S. P.; Carvalho, A.; Vagnarelli, P.; Earnshaw, W. C.** 2001. INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr. Biol.* 11(11), Jun 5, 886-890.
- Winey, M.; Byers, B.** 1993. Assembly and functions of the spindle pole body in budding yeast. *Trends Genet.* 9 (9), Sep, 300-304.
- Winey, M.; Huneycutt, B. J.** 2002. Centrosomes and checkpoints: the MPS1 family of kinases. *Oncogene* 21(40), Sep 9, 6161-6169.
- Winston, J. T.; Koepf, D. M.; Zhu, C.; Elledge, S. J.; Harper, J. W.** 1999. A family of mammalian F-box proteins. *Curr. Opin.* 9, 1180-1182.
- Witczak, O.; Skalhegg, B. S.; Keryer, G.; Bornens, M.; Tasken, K.; Jahnsen, T.; Orstavik, S.** 1999. Cloning and characterization of a cDNA encoding an A-kinase anchoring protein located in the centrosome, AKAP450. *EMBO J.* 18, 1858-1868.
- Wu, H.; Lan, Z.; Li, W.; Wu, S.; Weinstein, J.; Sakamoto, K. M.; Dai, W.** 2000. p53CDC/hCDC20 is associated with BUBR1 and may be a downstream target of the spindle checkpoint kinase. *Oncogene* 19 (40), Sep 21, 4557-4562.
- Wu, X.; Bayle, J. H.; Olson, D.; Levine, A. J.** 1993. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 7, 1126-1132.
- Xiong, Y.; Hannon, G. J.; Zhang, H.; Casso, D.; K. R.; Beach, D.** 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704.
- Xu, B.; Kim, S.; Kastan, M. B.** 2001. Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol. Cell Biol.* 21, 3445-3450.
- Yamamoto, A.; Guacci, V.; Koshland, D.** 1996. Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 133 (1), Apr, 85-97.
- Yamamoto, A.; Guacci, V.; Koshland, D.** 1996b. Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J. Cell Biol.* 133 (1), Apr, 99-110.
- Yamano, H.; Gannon, J.; Hunt, T.** 1996. The role of proteolysis in cell cycle progression in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* 15 (19), Oct 1, 5268-5279.
- Yanagida, M.** 2000. Cell cycle mechanisms of sister chromatid separation; roles of Cut1/separin and Cut2/securin. *Genes Cells* 5 (1), Jan, 1-8. Review.

- Yang, J.; Liu, X.; Bhalla, K.; Kim, C. N.; Ibrado, A. M.; Cai, J.; Peng, T. I.; Jones, D. P.; Wang, X.** 1997. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275 (5303), Feb 21, 1129-1132.
- Yeong, F. M.; Lim, H. H.; Padmashree, C. G.; Surana, U.** 2000. Exit from mitosis in budding yeast: biphasic inactivation of the Cdc28-Clb2 mitotic kinase and the role of Cdc20. *Mol. Cell* 5 (3), Mar, 501-511.
- Yin, D.; Xie, D.; Sakajiri, S.; Miller, C. W.; Zhu, H.; Popoviviu, M. L.; Said, J. W.; Black, K. L.; Koeffler, H. P.** 2006. DLK1: increased expression in gliomas and associated with oncogenic activities. *Oncogene* 25, 1852-1861.
- Yonish-Rouach, E.; Borde, J.; Gotteland, M.; Mishal, Z.; Viron, A.; May, E.** 1994. Induction of apoptosis by transiently transfected metabolically stable wt p53 in transformed cell lines. *Cell Growth Differ.* 1, 39-47.
- Yonish-Rouach, E.; Resnitzky, D.; Lotem, J.; Sach, L.; Kimchi, A.; Oren, M.** 1991. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 353, 345-347.
- Yu, H.** 2002. Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (6), Dec, 706-714.
- Yu, J.; Zhang, L.; Hwang, P. M.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.** 2001. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol. Cell* 7, 673-682.
- Zachariae, W.; Nasmyth, K.** 1999. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* 13, 2039-2058.
- Zeitlin, S. G.; Shelby, R. D.; Sullivan, K. F.** 2001. CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J. Cell Biol.* 155, 1147-1157.
- Zetterberg, A.; Larsson, O.** 1985. Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5365-5369.
- Zhang, X.; Horwitz, G. A.; Prezant, T. R.; Valentini, A.; Nakashima, M.; Bronstein, M. D.; Melmed, S.** 1999. Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol. Endocrinol.* 13, 156-166.
- Zhang, J.; Ma, Z.; Treszezamsky, A.; Powell, S. N.** 2005. MDC1 interacts with Rad51 and facilitates homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* Sep 25.
- Zou, H.; McGarry, T. J.; Bernal, T.; Kirschner, M. W.** 1999. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* 285 (5426), Jul 16, 418-422.

Zou, H.; Stemmann, O.; Anderson, J. S.; Mann, M.; Kirschner, M. W. 2002. Anaphase specific auto-cleavage of separase. *FEBS Lett.* 528, 246-250.

Zur, A.; Brandeis, M. 2001. Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *EMBO J.* 20, 792-801.