

INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

LA INVESTIGACIÓN DE LA MITOSIS: HISTORIA Y BIOQUÍMICA

DISCURSO LEÍDO EN LA SOLEMNE SESIÓN INAUGURAL
DEL CURSO ACADÉMICO CELEBRADA EL 19 DE ENERO DE 2023
POR EL

EXCMO. SR. DON JOSÉ MIGUEL ORTIZ MELÓN
ACADÉMICO DE NÚMERO DE LA RANF



Madrid, 2023

ISBN: 978-84-122587-3-8
Depósito Legal: M-29927-2022

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
2. HISTORIA DE LA INVESTIGACION DE LA MITOSIS	7
2.1 La primera descripción de la Mitosis.....	7
2.2 Interacciones núcleo-citoplásmicas en la Mitosis	9
2.3 El descubrimiento de ciclina	10
2.4 El control genético del ciclo celular.....	10
2.5 Descubrimientos que relacionan MPF con Cdk	12
2.6 La destrucción de ciclina y securina en Mitosis de levaduras y mamíferos	13
2.7 La identificación de centrómeros en levaduras	13
2.8 Diversos fenotipos mitóticos mutantes amplían nuestra comprensión de la Mitosis.....	14
3. BIOQUÍMICA DE LA MITOSIS.....	16
3.1 La entrada en mitosis	18
3.2 Inhibición de Protein Fosfatasas	20
3.3 La separación de cromátidas	22
3.4 La salida de mitosis	23
3.5 Sistemas de regulación y control	24
3.6 Fosforilación dinámica y coordinación entre protein quinasas y fosfatasas	25
4. INESTABILIDAD CROMOSÓMICA, ANEUPLOIDIA Y CÁNCER... ..	29
4.1 Un vínculo inesperado entre la aneuploidía y el envejecimiento... ..	31
5. OBSERVACIONES FINALES Y DIRECCIONES FUTURAS	32
6. BIBLIOGRAFÍA	34

Excmo. Sr. Presidente,
Sras. y Srs. Académicos,
Señoras y Señores.

Agradezco a la Junta de Gobierno y a los miembros de la sección Segunda de Biología, Biotecnología y Farmacocinética por el distinguido encargo de pronunciar el discurso de apertura de la Real Academia Nacional de Farmacia del curso Académico del año 2023

1. INTRODUCCIÓN

En el libro titulado *¿Qué es la vida?* (1) el científico y Premio Nobel británico Paul Nurse expone que en Biología hay 4 ó 5, Grandes Ideas y que si estas ideas se combinan entre si nos ayudan a entender qué es la vida y su complejidad.

Entender qué es la vida desde la Biología, no es solamente algo apasionante, dice Nurse, sino también necesario porque muchas actividades están poniendo en peligro los ecosistemas y para conservar la vida tal y como la conocemos vamos a necesitar todos los conocimientos que podamos obtener estudiando el mundo vivo. Así pues, necesitamos entender lo mejor posible qué es la vida.

Una de las ideas para entender qué es la vida y sobre todo cómo funciona, es que muchas de las actividades de la vida pueden ser entendidas en términos de Química, esto es de las reacciones químicas que tienen lugar en las células. Es una idea que tiene sus orígenes en los estudios sobre la fermentación. Lavoisier (1743-1794) uno de los fundadores de la Química moderna propuso que “la fermentación era una reacción química”. Algunos años más tarde, Pasteur, identificó las levaduras como el “fermento” responsable, y llegó a concluir que las reacciones químicas eran “la expresión de la vida de las células.” Trabajos realizados a finales del siglo XIX y principios del XX, por célebres investigadores como Berthelot, los hermanos Buchner y otros, mostraron finalmente que la fermentación, podía ser reducida a reacciones químicas catalizadas por sustancias intracelulares llamadas enzimas.

Generalizando a partir de estos resultados, se puede decir, que la mayoría de las actividades de las células están basadas en reacciones químicas catalizadas por enzimas. En su interior tienen lugar de manera simultánea miles de reacciones químicas y estas son responsables de los fenómenos vitales de los organismos vivos.

Cada una de estas reacciones requieren un microambiente específico para llevar a cabo su función de manera efectiva y estos microambientes necesitan estar separados unos de otros. Las células, utilizan una serie de mecanismos para llevar a cabo esto. Al nivel más simple, las superficies de los enzimas proporcionan espacios que pueden aislarse del ambiente local. Si los enzimas se combinan entre sí, se generan complejos, los cuales presentan mejores oportunidades para el aislamiento del microambiente químico. Esto conduce, a la canalización de sustratos y productos desde un enzima al siguiente, a través de una serie ordenada de reacciones que constituyen las llamadas rutas metabólicas. Los complejos de enzimas pueden a su vez, formar verdaderas máquinas moleculares aisladas del ambiente local, como los ribosomas, responsables de la síntesis de proteínas. Los orgánulos subcelulares rodeados de membranas proporcionan un modo de poder confinar en compartimentos algunas reacciones químicas. Finalmente, la célula entera rodeada por una membrana plasmática separa el contenido celular total del mundo externo. Esta variedad de microambientes organizados espacialmente da lugar a la compleja estructura de la célula.

La organización biológica opera en un rango de niveles que va desde las células a los organismos, las poblaciones y los ecosistemas. Desde hace tiempo, los bioquímicos se han especializado en estudiar la vida a nivel celular, porque la célula no es solo la unidad estructural sino también la unidad funcional de la vida y exhibe todas sus características

Por otra parte, según el famoso científico y Premio Nobel francés J. Monod, las células y los procesos vitales contienen lo que él llamo “teleonomía”, una organización y una serie de comportamientos encaminados a un propósito (2).

La división celular es uno de estos procesos y la Mitosis es una fracción del ciclo de división celular. El objetivo de la Mitosis (el propósito) es separar el genoma tras su duplicación y asegurar que las dos células hijas heredan un complemento de cromosomas igual e idéntico. Para ello, las células construyen una estructura

temporal llamada huso mitótico. Es sin duda uno de los principales procesos celulares.

La historia de la investigación de la mitosis comienza antes del descubrimiento del ADN como depósito de información genética. Se ha logrado un rápido progreso desde la introducción de la tecnología de ADN recombinante y descubrimiento del control universal del ciclo celular. Hay una gran cantidad de genes implicados, la mayoría conservados, que son necesarios para la progresión de las etapas mitóticas tempranas a tardías.

En este discurso, voy a hacer una descripción histórica de la investigación de la mitosis señalando la importancia de diversos organismos modelo que se han utilizado y exponer que dos procesos bioquímicos, la fosforilación dinámica y la proteólisis, son los principales mecanismos de regulación. Hay tres etapas en la mitosis que tienen lugar de manera ordenada en el tiempo: la entrada en mitosis, la separación de las cromátidas y la salida de mitosis.

Quiero destacar también, que aspectos relacionados con la bioquímica de la mitosis son relevantes para problemas biomédicos actuales como el cáncer o el envejecimiento.

2. HISTORIA DE LA INVESTIGACION DE LA MITOSIS

2.1 La primera descripción de la Mitosis

Mitosis significa “hilo” en griego. En el siglo XIX, investigadores pioneros en técnicas de microscopía óptica descubrieron estructuras en forma de hilos en células teñidas con colorantes antes de la división celular. Llamaron a esta etapa “mitosis” por la apariencia de los hilos. Ahora se sabe que los hilos son cromosomas condensados, que se hacen visibles con ayuda de microscopía óptica durante una etapa mitótica llamada profase. A esta le sigue la metafase (en la que los cromosomas se alinean en el medio de la célula), luego la anafase A en la que las cromátidas idénticas (que comprende los cromosomas individuales) se separan y se mueven hacia los polos opuestos de la célula. Le sigue la anafase B, en la que el huso se alarga y los cromosomas se acercan a los polos y la Telofase, fase terminal de la mitosis durante la cual los cromosomas se descondensan, volviéndose

nuevamente invisibles, la membrana nuclear se reforma y el huso se desmonta antes de la citoquinesis o división celular (ver Fig.1 para la terminología relacionada con las fases G₁, G₂, S y M).

En comparación con el ciclo de división celular completo, la mitosis es un período breve, durante el cual los cromosomas condensados se segregan con precisión en núcleos hijos, con la ayuda de un conjunto de microtúbulos, de polo a polo, formando un huso. Además, hay otros microtúbulos más cortos, llamados microtúbulos astrales, que irradian desde los polos del huso hacia la corteza celular, en tanto que los llamados microtúbulos del cinetocoro se unen a la región de unión a los cromosomas (llamados cinetocoros). Esto va seguido normalmente por la citoquinesis que genera dos células hijas.

La primera persona en observar la mitosis en detalle fue un biólogo alemán, Walther Flemming, pionero de la investigación de la mitosis de y también fundador de la citogenética (3). Flemming describió el comportamiento de los cromosomas durante la mitosis con asombrosa precisión en una colección de 1882 titulada *Sustancia celular, núcleo y división celular*. Para la visualización de los cromosomas, Flemming utilizó colorantes de anilina, que se unen a los cromosomas.

Cromosoma, en griego, significa cuerpo coloreado (“croma”) (“soma”). Un cromosoma es una estructura organizada de ADN, proteínas y ARN, que cambia su forma de manera espectacular durante el ciclo celular y bajo diferentes condiciones fisiológicas y fisicoquímicas.

La mayor parte del trabajo de Flemming se llevó a cabo antes del re-descubrimiento (1900) de los principios genéticos descubiertos por Mendel (1822-1884). Flemming no tenía conocimiento del ADN, que fue descubierto como una sustancia llamada “nucleína” en 1869 por el bioquímico suizo, Friedrich Miescher, y mucho más tarde, identificado como material genético por Oswald y Avery (4).

Flemming utilizó una especie de salamandra como fuente de su material porque las salamandras tienen cromosomas muy grandes. El tamaño del genoma en las salamandras, puede ser aproximadamente 10 veces mayor que el de los humanos, porque contiene una gran cantidad de ADN repetidos. En la época de Flemming, las células que contenían cromosomas grandes eran una gran ventaja por facilitar

su observación. Posteriormente, los cromosomas grandes de las células epiteliales de los pulmones de tritón, han demostrado ser también útiles en la filmación de videos de alta resolución de la mitosis (5). Finalmente, el comportamiento detallado de los cromosomas individuales (6) en la prometafase, fue claramente observado por video microscopía de contraste de interferencia (Nomarsky) en los años 1990 (7).

2.2 Interacciones núcleo-citoplásmicas en la Mitosis

Las técnicas de cultivo de células de mamíferos comenzaron en el siglo XIX por un zoólogo alemán, Wilhelm Roux. Las células aisladas de tejidos, primero se cultivaban en cultivos primarios y luego se mantenían como líneas celulares o se almacenaban para otros usos. El cultivo de células animales se convirtió en una técnica convencional en la década de 1970. Rao y Johnson realizaron experimentos clave que mostraron la inducción de la mitosis por factores de difusión libre (8) (9). Usando la técnica de fusión celular, mezclaron núcleos en diferentes fases del ciclo celular en el mismo citoplasma (heterocarion) e intentaron determinar si núcleos en diferentes fases del ciclo celular podían influirse entre sí. Sus resultados fueron bastante sorprendentes.

Cuando las células de la fase M se mezclaron con células en fase G_1 , S o G_2 , se produjeron mitosis prematuras mostrando la existencia de factores difusibles capaces de promover la fase M en los núcleos en interfase. Cuando los núcleos en fase S se mezclaron con núcleos en fase G_1 , los núcleos G_1 también fueron inducidos a iniciar la fase S, lo que sugiere que los núcleos en fase S contienen también un factor difusible que induce la replicación de ADN. En cambio, cuando los núcleos en fase S se mezclaron con núcleos en fase G_2 , estos no reiniciaron la fase S.

Estos resultados sugirieron que los factores de inducción difusibles se producen en los núcleos durante las fases S y M y que el factor promotor de la fase S solo funciona en G_1 . El factor promotor de la fase M en cambio funciona en todo el ciclo. Los experimentos de Rao y Johnson utilizando células de mamífero, prepararon el terreno para descubrir las regulaciones del ciclo celular de mamíferos que condujeron al descubrimiento de los factores promotores de la Mitosis (MPF) y de las quinasas dependientes de ciclina (CDK).

2.3 El descubrimiento de ciclina

La segunda observación sobre MPF fue que su actividad oscilaba durante el ciclo celular, sugiriendo que MPF podía estar ligado a “un reloj celular”.

Tim Hunt, bioquímico americano que trabajaba en la estación marítima de Woods Hole, en Estados Unidos, estudiaba el patrón de síntesis de proteínas tras la fertilización en el erizo de mar. El erizo de mar produce, tras la fertilización, ciclos celulares embrionarios que se caracterizan porque carecen de fases G_1 y G_2 . Es decir, en ellos, la fase S va seguida directamente de la Mitosis y de división celular.

Incubando huevos de erizo de mar fertilizados con un aminoácido radiactivo y recogiendo muestras para su análisis, Hunt y cols. encontraron que varias bandas de proteínas se acumulaban y que, una de ellas, desaparecía en la mitosis. La conclusión a la que llegaron fue la existencia de una proteína llamada “ciclina” que experimentaba una síntesis continua seguida de degradación, probablemente por un proceso de proteólisis. (10)

2.4 El control genético del ciclo celular

Durante muchos años, la humanidad ha dependido de la levadura de gemación *Saccharomyces*, para hacer el pan y la cerveza. En 1857, Louis Pasteur (1822-1895) descubrió el proceso de fermentación con levadura y demostró que la fermentación alcohólica era llevada a cabo por células de levadura vivas y no por un catalizador químico. En el laboratorio, los bioquímicos han utilizado intensamente la levadura para estudiar las funciones enzimáticas en diversas vías metabólicas. Leland Hartwell, biólogo molecular americano especializado en la síntesis de ADN de mamífero, dirigió su atención a la genética de la levadura sobre 1965 e introdujo un nuevo enfoque para la investigación del ciclo celular. En un trabajo inicial aisló y caracterizó 400 mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* sensibles a la temperatura (ts), y defectuosos en ciertos aspectos del ciclo de división celular (11). Estos mutantes eran incapaces de formar colonias en medios de cultivo a 36 °C, pero crecían normalmente a 23 °C. Se estudiaron así, mutantes de pérdida de viabilidad, de cambio morfológicos, de aumento de número células, de capacidad de síntesis de proteínas, de ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN), etc. después de un cambio de 23 °C (temperatura permisiva) a

36 °C (temperatura restrictiva). Se encontraron mutaciones que daban lugar a una pérdida de capacidad para la síntesis de proteínas, síntesis de ARN, síntesis de ADN, división celular o la formación de pared celular. Al caracterizar mutantes de genes que controlan diferentes etapas del ciclo celular, se denominaron mutantes *cdc* (del ciclo de división celular).

Después de caracterizar mutantes *cdc* en las etapas diferentes del ciclo celular, Hartwell, propuso un modelo que explica el orden de los sucesos del ciclo celular deducido de los fenotipos de mutantes ts en la levadura de gemación. Estos estudios pioneros, se realizaron antes de la era de la clonación y secuenciación de ADN y de la tecnología de ADN recombinante. En el momento del aislamiento de los mutantes *cdc*, no había esperanzas concretas de que los genes de las mutaciones y las funciones moleculares de los productos génicos fueran a ser aclarados en un futuro próximo. Sin embargo, Hartwell y sus colaboradores identificaron el gen *CDC28* como el regulador crucial del ciclo celular, que más tarde resultó ser la subunidad catalítica de CDK1.

La levadura de fisión, *Schizosaccharomyces pombe*, es también un modelo para estudiar el control del ciclo celular, la mitosis y la Biología del genoma. *S. pombe* posee aproximadamente 5000 genes y se cree que se separó en la evolución de *S. cerevisiae* hace unos mil millones de años. Los estudios en paralelo de ambas levaduras son útiles porque lo que es cierto en ambas levaduras a menudo es aplicable a los vertebrados. Mitchison y Leupold, iniciaron la fisiología celular y la genética de *S. pombe* en la década de 1950 (12) (13). Las células vegetativas de *S. pombe* tienen forma de bastoncillo y el microorganismo aumenta de longitud durante su crecimiento. Utilizando esta propiedad, Fantes y Nurse (14) aislaron mutantes en el tamaño celular. Más tarde se encontró que mutantes defectivos en *Cdc2*, *Wee1* y *Cdc25*, eran importantes quinasas y fosfatasas de regulación del ciclo celular (15). La levadura de fisión tiene sólo tres cromosomas, y la condensación del cromosoma mitótico se visualizó utilizando una sonda fluorescente, DAPI (1,4-diaminidino-2- fenilindol), para la tinción de ADN (16). Su genoma contiene heterocromatina, con la histona H3 metilada en lisina 9 en centrómeros, telómeros, e incluye numerosos ARN no codificantes (17).

2.5 Descubrimientos que relacionan MPF con Cdk

Los estudios de Rao y Johnson mostraron que las interacciones núcleo- citoplasma son importantes para la regulación de la mitosis. Masui y Markert (18) plantearon la hipótesis de la presencia de un factor citoplasmático llamado MPF (Mitosis Promoting Factor) en la embriogénesis de huevos de rana (*Rana pipiens*) tratados con progesterona. Inyectando citoplasma de ovocitos tratados con progesterona en varias etapas de maduración pudieron identificar actividades citoplásmicas. La sustancia responsable no fue identificada en el momento, pero la producción de MPF no se veía afectada por la eliminación del núcleo. MPF fue identificado más tarde por el hecho de causar la ruptura de la vesícula germinal en ovocitos de *Xenopus* y por inducir la metafase mitótica en un sistema libre de células. Diecisiete años después del descubrimiento inicial, Lohka et al. (19) informaron de la purificación de MPF a partir de extracto de huevo mediante precipitación con sulfato amónico y seis pasos cromatográficos. En las preparaciones más purificadas estaban presentes dos bandas de proteínas. Este material contenía una intensa actividad de proteína quinasa que fosforiló la histona H1. Ese mismo año, Maller y colaboradores (20) informaron que uno de los dos componentes en el MPF purificado, era en realidad el homólogo de la quinasa de levadura de fisión *Cdc2* (homólogo a su vez de la de levadura de gemación *CDC 28*). La otra banda fue identificada como la ciclina mitótica (10). Estos descubrimientos comunicados casi simultáneamente en varios laboratorios, aceleró la fusión de la investigación de la mitosis, la cual había consistido anteriormente en científicos que trabajan en diferentes disciplinas con diferentes organismos, tales como la levadura de fisión, la levadura de gemación, moscas, almejas, ovocitos de rana, y células de mamíferos. La unificación de la investigación del ciclo celular por lo tanto se produjo a través del descubrimiento de MPF y CDK como los reguladores del ciclo celular conservados desde la levadura a eucariotas superiores (15). La biología molecular de la investigación sobre el cáncer también fue influenciada por el descubrimiento del mecanismo básico de control del ciclo de división celular, simbolizado por CDK.

2.6 La destrucción de ciclina y securina en Mitosis de levaduras y mamíferos

Usando extractos de ovocitos de almeja, Hershko y colaboradores, identificaron el gran complejo llamado ciclosoma (21) (llamado también complejo promotor de anafase (APC) (22) (23) que contiene una actividad de ubiquitina ligasa específica de ciclina-B. Este APC/ciclosoma modifica la ciclina mitótica por poliubiquitinación, promoviendo su destrucción por el proteosoma 26S. Se encontró que el mismo complejo era necesario para la degradación mediada por ubiquitina de la levadura de fisión Cut2, de Pds1 de la levadura de gemación, y la hP-TTG1 humana (denominada colectivamente “securina”) que son esenciales para la segregación cromosómica (24) (25). La destrucción de securina es necesaria para la segregación cromosómica adecuada y la secuencia señal para la destrucción, llamada caja de destrucción, se puede intercambiar entre la ciclina mitótica Cdc13 de la levadura de fisión y securina Cut2, de modo que el momento de la destrucción parecía estar bajo la misma ruta. El papel de la APC / ciclosoma es por tanto coordinar el control mitótico con la segregación cromosómica. El papel real de securina es estar asociada con una proteasa denominada separasa, esencial para la escisión de la subunidad de cohesina. Securina actúa como una chaperona inhibidora de la separasa. La pérdida de securina promueve así la activación de la actividad separasa.

2.7 La identificación de centrómeros en levaduras

Los estudios de secuenciación y clonación de genes eucariotas se llevaron a cabo por primera vez utilizando *S. cerevisiae* como modelo eucariota porque este organismo contenía un plásmido de 2 μ m que se utilizó como fuente de genes. Cualquier gen insertado en el plásmido con un marcador apropiado podía ser aislado y secuenciado lo que permitía la identificación del producto génico. Hinnen y cols. (26) transformaron una cepa de levadura que requería leucina, *leu2*, usando un plásmido que portaba el gen de levadura LEU2. Los transformantes Leu^+ resultantes, contenían un plásmido que portaba el gen. La secuencia de ADN del plásmido integrado en el ADN genómico de levadura se comportó como ADN genómico de levadura en la mitosis y meiosis.

Un avance significativo tuvo lugar cuando Clarke y Carbon (27) (28) identificaron un centrómero de levadura funcional. Primero aislaron el gen *CDC10*,

que está cerca del centrómero del cromosoma III, mediante la transformación de mutantes *ts cdc10*. En la segunda etapa, Clarke y Carbon aislaron una pequeña parte de un centro funcional. Cuando este se encuentra presente en un plásmido que lleva un replicador de ADN cromosómico de levadura, este ADN (designado CEN3) permitió al plásmido funcionar como un minicromosoma. Estos minicromosomas circulares son estables en la mitosis y se segregan como cromosomas en la primera y segunda divisiones meióticas. De hecho, el centrómero de levadura era bastante corto, sólo varios cientos de pares de bases. En otros organismos, como la levadura de fisión, las moscas y los mamíferos, sin embargo, los centrómeros son más grandes, requiriendo diferentes enfoques para su identificación y aislamiento.

Los análisis de minicromosomas construidos artificialmente por electroforesis en gel de campo pulsante, mostraron que el tamaño del centrómero de *S. pombe* es de 30 a 130 kb. mucho más grande que el de *S. cerevisiae*, que es del orden de 0,1 kb (29)(30). Se obtuvieron también minicromosomas lineales mediante doble truncamiento seguido de secuencias teloméricas. Estos minicromosomas de 30 a 160 kb fueron útiles para definir regiones centrómericas funcionales de *S. pombe* y para determinar toda la secuencia repetitiva del centrómero (31) (32). Las repeticiones centroméricas son heterocromáticas porque la histona H3 está metilada y la proteína heterocromatina 1 (HP-1), es abundante. La región del centrómero central se asocia con la Histona H3 CENP-A-like y Mis12 que forman la base del cinetocoro y son esenciales para la segregación cromosómica. Esta región unida a CENP-A-like y CNP+, que contiene nucleosomas, promueve el montaje del cinetocoro en la mitosis. Varias de las proteínas unidas a las regiones del centrómero central se conservan en eucariotas superiores. Aunque la organización de la secuencia de ADN de centrómeros difiere entre organismos, las proteínas unidas al centrómero y las regiones pericentroméricas están muy conservadas lo que permite la conservación de los mecanismos de segregación que requieren proteínas de unión a centrómero.

2.8 Diversos fenotipos mitóticos mutantes amplían nuestra comprensión de la Mitosis

Se han aislado mutantes defectuosos en la mitosis de varios organismos modelo, desde hongos hasta mamíferos, con el objetivo de comprender las funciones de los genes esenciales para la mitosis. También se han aislado mutantes *ts* en célu-

las de mamífero (33). Un cribado sistemático de mutantes mitóticos de levadura de fisión (ts y también sensibles al frío, cs) permitió la identificación de varios genes y la caracterización de sus productos (34). Se encontraron así tres defectos principales de segregación cromosómica para este organismo a la temperatura restrictiva. Por ejemplo el mutante en β -tubulina *nda3 cs* se detiene en la mitosis a 22 °C debido a la ausencia de huso, lo que resulta en activación del sistema de control del ensamblaje del huso (SAC). Mutantes en DNA topoisomerasa II (*top 2*) mostraban un fenotipo llamado *cut*. En estas células la citoquinesis dividió por la mitad el núcleo, de ahí el nombre, ya que no se había dividido durante la anafase debido a una mutación en ADN topoisomerasa II (35). Los mutantes de proteínas asociados a centrómeros, como *mis6*, produjeron una segregación cromosómica desigual, lo que resultaba en células con núcleos hijos de diferente tamaño, grandes y pequeños (36).

El descubrimiento de la implicación de DNA topoisomerasa (37) supuso la constatación de que el enrollamiento, desenrollamiento, encadenamiento y desencadenamiento de DNA tienen que ocurrir para que el ADN se utilice correctamente. Varias topoisomerasas controlan diferentes aspectos de los problemas topológicos del ADN (37). Para dilucidar el papel de la topoisomerasa en la formación de cromosomas mitóticos, se utilizó un enfoque genético-bioquímico. Se aislaron mutantes de *S. pombe* defectuosos en la actividad de Top2 ensayando un gran número de extractos mutantes. Con mutantes ts y cs *top2*, se estableció que Top2 es necesario tanto para la segregación como para la condensación de cromosomas (35). Top2 demostró ser esencial para la mitosis de levadura en gemación (38). La topoisomerasa de tipo 1 se superpone parcialmente en función (actividad relajante) con Top2, de modo que el doble mutante produjo un fenotipo no mitótico en el que el bloqueo del ciclo celular se produce durante la interfase y el nucleolo es destruido (35).

El curioso fenotipo de corte (cell untimely torn, o cut), que dividía el núcleo durante citoquinesis, se utilizó como un marcador para aislar otros mutantes con fenotipos similares. Se aislaron varios mutantes que producían fenotipos en forma de corte y se identificaron sus productos génicos. Todos los mutantes de tipo corte resultaron ser defectuosos en importantes pasos mitóticos, como la condensación cromosómica, segregación, activación de separase, control de proteólisis mediada por ubiquitina, formación de huso, alargamiento del huso, citoquinesis, etc. (34).

Drosophila es un organismo atractivo en el que estudiar tanto las rondas rápidas de mitosis típicas del desarrollo embrionario como los ciclos celulares más largos que suceden más tarde en el desarrollo (39). Los estudios biológicos moleculares de la mitosis de la mosca de la fruta se hicieron posibles después del descubrimiento de mutantes de *Drosophila* y el uso de reactivos, promovidos por Nuesslein-Volhard (40). Glover y colaboradores descubrieron las proteínas quinasas Polo y Aurora, con papeles importantes en la progresión de la mitosis desde etapas temprana hasta el final. (41) (42). El descubrimiento de estas quinasas inauguró un nuevo enfoque para comprender cómo se regula todo el proceso mitótico, incluida la segregación cromosómica y la citoquinesis posterior. Aunque CDK1 se inactiva durante la transición de la metafase a la anafase, Polo y Aurora quinasas permanecen activas hasta la telofase porque también regulan la citoquinesis. Mutantes de *Drosophila* en Polo y Aurora revelaron defectos severos en la mitosis y citoquinesis con defectos pleiotrópicos en la segregación cromosómica. Polo y Aurora están presentes desde hongos hasta eucariotas superiores (43) y son importante en la organización de eventos mitóticos, tales como la regulación de CDK, la formación del huso, la activación del centrosoma, la cohesión y condensación del cromosoma, etc. (44) (45).

El concepto de cohesión de cromátidas fue inicialmente desarrollado también en la genética de la mosca de la fruta. La terminología de cohesión de cromátidas hermanas comenzó con los artículos de Orr-Weaver (46) que aclararon el fenotipo de la mutación *mei-S332* de la mosca de la fruta que mostraba un defecto en cohesión de cromátidas.

3. BIOQUÍMICA DE LA MITOSIS

El objetivo de la Mitosis es separar el genoma y asegurar que las dos células hijas heredan un complemento de cromosomas igual e idéntico. Para conseguir esto las células eucarióticas reorganizan completamente su sistema de microtúbulos para construir el huso mitótico que tira y separa las cromátidas hermanas después de cortar los complejos proteicos que las unen (47) (48) (49) (50). Posteriormente utilizan el citoesqueleto de actina para dividir en dos la célula (51).

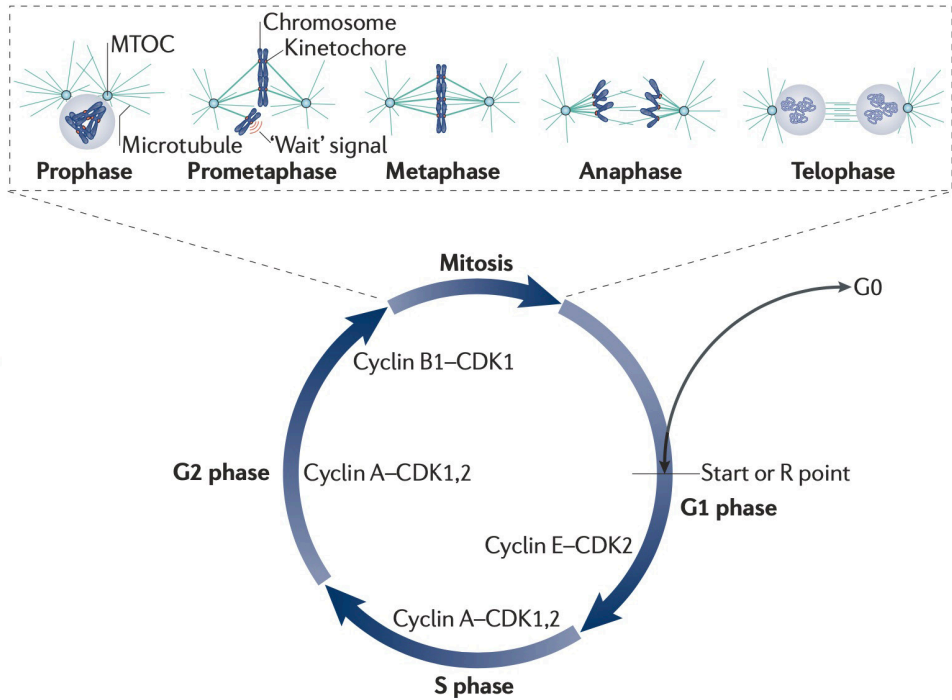


Figura 1. En las células animales cada fase del ciclo celular está controlado por un complejo proteico formado por una quinasa dependiente de ciclina (CDK) y distintas ciclinas A, B y E. En la mitosis es el complejo ciclina B-Cdk. En la parte superior en forma expandida las distintas etapas de la mitosis.

La reorganización de la célula durante la mitosis debe estar coordinada en el tiempo y en el espacio. Hay varios sucesos clave que tienen lugar de manera perfectamente ordenada en el tiempo. La entrada en mitosis, la separación de cromátidas y la salida de mitosis son llevadas a cabo de un modo unidireccional por la maquinaria bioquímica. Junto a la coordinación temporal los mecanismos de control están organizados también espacialmente.

La tecnología de detección de gradientes en el interior de las células ha mejorado drásticamente el conocimiento de esta organización espacial y, estos a su vez, han revelado la importancia de gradientes locales de protein quinasa y fosfatasas antagónicas, reguladores de proteínas que unen GTP y de ubiquitin ligasas y deubiquitinasas (52).

3.1 La entrada en mitosis

La entrada en mitosis parece tener las características de un “interruptor” en la mayoría de los organismos estudiados. Una vez que la célula decide iniciar la mitosis no hay vuelta atrás (Fig.1). Cómo se construye este interruptor difiere en los diferentes sistemas biológicos. Sin embargo, el corazón de este interruptor es el mismo en todas las células: la activación de una proteína quinasa llamada ciclinaB-Cdk1(15). La combinación de genética, biología celular, y bioquímica ha permitido identificar a esta proteína quinasa como el regulador clave de la mitosis y este mecanismo se ha conservado desde la levadura al hombre.

La quinasa es un heterodímero compuesto de la subunidad quinasa dependiente de ciclina, Cdk, y una subunidad ciclina activadora de la quinasa. Ambos componentes son miembro de familias multigénicas y las ciclinas tipo B son las esenciales en iniciar la mitosis. El complejo ciclina-Cdk también se encuentra unido a una ciclina-Cdk más pequeña llamada Ck que se une a P-Ser/P-Thr y retiene la interacción con sustratos fosforilados por ciclina-Cdk. Esto permite la hiperfosforilación del sustrato incluso en sitios de baja afinidad y es importante en la activación de sustratos y del complejo promotor de la anafase (APC/C) (53).

Se ha podido determinar la estructura cristalina de diferentes ciclinas, Cdks y complejos ciclina-Cdk y estos estudios permiten concluir que la subunidad Cdk es inactiva totalmente en ausencia de ciclina (54) (55) (56). La unión de ciclina altera la estructura de Cdk de tal manera que la activa. Otro de estos cambios es la fosforilación por CAK (Cdk activating kinase).

La unión de ciclina y la fosforilación por CAK es utilizada para controlar la entrada en mitosis si se alcanza un “umbral” de actividad ciclina-Cdk. En algunos sistemas biológicos como en la levadura de fisión (57), y en los ciclos embrionarios de *Drosophila* la necesidad de alcanzar ese “umbral” ha sido demostrada (58) (59). En otros sistemas, el complejo ciclina-Cdk se acumula de forma inactiva por fosforilación en residuos de serina o treonina en el bolsillo de unión a ATP de Cdk. En estos casos, el complejo es activado por defosforilación de los sitios inhibitorios (60). La familia Wee1 de protein quinasas y Cdc25 fosfatasa actúan en este proceso y también están conservadas desde la levadura a células animales (61).

La capacidad de control del regulador clave de la entrada en mitosis por fosfo/defosforilación, permite la integración de señales procedentes de diferentes rutas las cuales controlan el tiempo de entrada en mitosis. Estas rutas de señalización dependen de la biología del organismo. En muchos sistemas, es la presencia de ADN sin replicar o dañado, lo que activa un punto de control para prevenir la mitosis. Esto se lleva a cabo por estabilización de Wee1 quinasas o inhibición de Cdc25 fosfatasa.

En la levadura de fisión, es el tamaño celular lo que controla el momento de la división y por ello el sistema Wee1-Cdc25 es regulado por la ruta TOR que responde al estado nutricional de la célula (62) (63). En otros sistemas el control es menos claro y se han implicado factores como el estrés. En células animales el complejo ciclina A-Cdk puede promover la mitosis por activación de la transcripción de otros reguladores mitóticos (64).

En varios sistemas hay evidencia de una activación local del complejo ciclina B-Cdk. La mayor es en el caso de la levadura de fisión en la que el complejo ciclinaB-Cdk es activado primero en el orgánulo que nuclea los microtúbulos para formar el huso mitótico (SPB, spindle pole body). El complejo ciclinaB-Cdk activado en el SPB recluta a su vez, a otro elemento regulador mitótico, la polo quinasa, Plk. Una vez reclutado al SPB, Plk dispara el crecimiento de la célula y establece el tiempo de iniciar la mitosis (65). Una cosa similar tiene lugar en el centrosoma en células animales (66) aunque no está claro como Plk regula el inicio de mitosis. En estas células, el complejo ciclina-Cdk cambia de localización entre el núcleo y citoplasma y la alteración de la relación núcleo-citoplasma puede contribuir a un bucle de retroalimentación positivo regulado espacialmente. En cualquier caso, el dímero ciclinaB-Cdk es el verdadero motor de la mitosis al fosforilar un gran número de sustratos y reguladores mitóticos y desempeña también un papel importante en la reestructuración de la célula mitótica. Así, el complejo ciclina-Cdk ha sido implicada en la remodelación del citoesqueleto de microtúbulos, en la arquitectura cromosómica, y en la regulación del comienzo de la anafase (67) (68). En muchas de estas actividades su actividad está coordinada con quinasas mitóticas como Plk y Aurora quinasas.

3.2 Inhibición de Protein Fosfatasa

La mayoría de los esfuerzos realizados en la investigación de la mitosis se han centrado en las proteínas quinasas esenciales como ciclina/Cdk, Plk, y Aurora quinasa, pero más recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia del control de las protein fosfatasa antagonistas (69). Rastreo genéticos y de si-RNA en levadura de fisión (70) y *Drosophila* (71) han permitido identificar dos familias de protein fosfatasa, denominadas PP1 y PP2A, cuyo papel es crucial en la anafase y la salida de mitosis. Además, la levadura de gemación *S. cerevisiae* depende de otra fosfatasa, *Cdc14*, para defosforilar sustratos, fosforilados por Cdk, para la salida de mitosis (72). Sin embargo, han sido los estudios en extractos de *Xenopus* los que primero pusieron de manifiesto la importancia de fosfatasa en la entrada en mitosis. Mochida y cols. mostraron que la activación de Cdk/ciclina B no era suficiente para arrastrar las células hacia la mitosis y que un miembro de la familia de PP2A que antagonizaba a ciclina B/Cdk debía ser inactivada también (73). Una serie de trabajos posteriores han revelado otro bucle de retroalimentación que funciona en esta etapa. Así, la Scant/ Greenwald (Gwl) quinasa es activada por ciclina/Cdk cuando las células entran en mitosis (74). Esto fosforila otra proteína abundante llamada ENSA/ARPP19. P-ENSA se une a un complejo de PP2A (B55) como un inhibidor competitivo del sustrato. P-ENSA es defosforilado lentamente por PP2A lo que permite a PP2A reactivarse una vez que ciclina/Cdk y Greenwald quinasa comienzan a declinar al final de la mitosis (Fig.2).

Este descubrimiento es particularmente importante porque hay solo un pequeño número de subunidades catalíticas de protein fosfatasa en las células y estas tienen un espectro muy amplio de especificidad de sustratos. La elección cuidadosa del sustrato se lleva a cabo por asociación de otras subunidades reguladoras formando complejos, cada uno de los cuales contiene una subunidad “reguladora” que la dirige exquisitamente al sustrato específico (75) (98). Esta subunidad recluta el complejo fosfatasa, un holoenzima, a un lugar determinado en la célula, muchas veces en un momento específico del ciclo celular. Un posible inhibidor de la subunidad catalítica inhibiría múltiples complejos al mismo tiempo y esto no permitiría una regulación a nivel espacial y de tiempo. Generando en cambio un inhibidor que tenga como diana uno de estos complejos, la célula es capaz de inhibir una subpoblación de complejos PP2A de un modo controlado espacial y temporalmente.

PP1 es otra fosfatasa abundante en las células. Su subunidad catalítica se encuentra asociada a diferentes subunidades reguladoras y los complejos (subunidad catalítica más reguladora) son asimismo, reclutados a proteínas específicas en momentos precisos. Estas proteínas tienen sitios de acoplamiento a PP1 en un motivo consenso RVXF (76) (77) (99). Además, hay una inhibición global de la actividad PP1 cuando la célula entra en mitosis porque la ciclina B/Cdk fosforila la subunidad catalítica en un sitio inhibitorio de su C terminal (78).

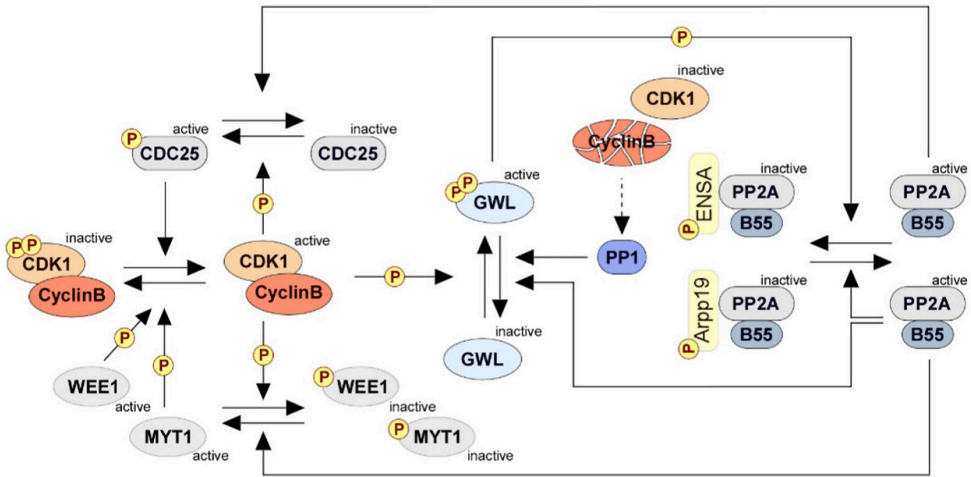


Figura 2. Circuito molecular que controla la entrada mitótica. (A) Las fosfatasas CDC25 defosforilan y activan CDK1-ciclina B para promover la entrada mitótica. La actividad de CDC25 antagoniza las fosforilaciones inhibitorias en CDK1 (Thr14 y Tyr15) catalizadas por MYT1 y WEE1. La CDK1-ciclina B activa inhibe y promueve respectivamente las actividades de MYT1/WEE1 y CDC25, estableciendo tanto un circuito de retroalimentación negativa doble como un circuito de retroalimentación positiva. Este circuito regulador define un disparador biestable que asegura una transición irreversible a la mitosis. CDK1-Cyclin B promueve aún más la activación de la quinasa GWL, que posteriormente fosforila ENSA y Arpp19. Las formas fosforiladas de estas endosulfinas se unen a PP2A-B55 e inhiben la actividad de la fosfatasa hacia los sustratos de CDK1-ciclina B, incluidos MYT1, WEE1 y CDC25.

3.3 La separación de cromátidas

Una vez que las células han entrado en la mitosis su progreso a través de esta etapa es regulada principalmente por proteólisis mediada por el sistema ubiquitina-proteosoma. Este sistema funciona alterando el balance local de protein quinasas y fosfatasas y a través de la activación de separasa, una proteasa que rompe los anillos de cohesina que mantienen unidas las cromátidas hermanas y centriolos (79). A su vez, la ubiquitin ligasa que controla la mitosis es regulada por un mecanismo de control que detecta si los cinetocoros se encuentran unidos a los MT del huso mitótico. Este paso es esencial para la separación de las cromátidas hermanas y para la estabilidad genómica.

La proteólisis mediada por ubiquitina es facilitada por enzimas E2 que transportan la ubiquitina y por E3 o ubiquitin ligasa, que se une a E2 y al sustrato, para ponerlos en proximidad (80). La enzima E2 transfiere la ubiquitina a la lisina más cercana que puede estar en el sustrato o en una misma ubiquitina ya conjugada previamente con el sustrato (81). De este modo, las cadenas de ubiquitina se van construyendo sobre el sustrato y estas cadenas de ubiquitina son reconocidos por receptores en el proteosoma 26S. Una vez poliubiquitilado, el sustrato se une al proteosoma, es desdoblado por ATPasas situadas en la tapa del proteosoma e introducidas en el cilindro catalítico de este, en el que la cadena peptídica se rompe en muchos lugares por proteasas (82).

La clave de este proceso es la ubiquitin ligasa E3 que controla la mitosis y que se conoce como APC/C (83). APC/C contiene 15 subunidades y es capaz de reconocer un gran número de proteínas cada una en diferentes etapas de la mitosis o de la fase G1 (84). APC/C reconoce sus sustratos a través de diferentes motivos proteicos de destrucción (“degrones”) que son reconocidos como formando parte de proteínas candidatas a ser destruidas.

El ciclosoma, APC/C se activa por fosforilación en la mitosis. Ciclina-Cdk fosforila APC/C y este aumento de actividad supone al mismo tiempo, un problema porque la célula requiere Ciclina-Cdk para permanecer en mitosis pero a su vez ciclina B es un sustrato de APC/C y su degradación inactiva Cdk. La solución se encuentra en el mecanismo de control de la formación del huso (SAC, spindle assembly checkpoint) que detecta los cinetocoros que no se encuentran unidos a microtúbulos (85), e impide que APC/C reconozca a ciclina B y a otro sustrato

clave securina (86). Los cinetocoros no unidos, reclutan otras proteínas llamadas MAD y BUB. El reclutamiento de estas proteínas a los cinetocoros no unidos cataliza la unión de un inhibidor de APC/C llamado complejo mitótico checkpoint (MCC) (87). Este complejo inactiva Cdc20 e impide a esta proteína activar APC/C (88).

La célula separa sus cromátidas hermanas unos minutos después de que APC/C degrade ciclina B y securina. Esto se debe a que ciclinaB-Cdk y securina inhiben la proteasa Separasa (89) que una vez activa rompe la subunidad Scc1 del complejo cohesina que mantiene unidas a las cromátidas. En células animales la mayor parte del complejo cohesina es eliminado por Plk1quinasa, pero los complejos cohesina permanecen en el centrómero protegidos por la proteína Shugosina que recluta una PP2A antagonista. Esto ilustra la importancia del control espacial de la actividad fosfatasa porque este complejo no debe ser inactivado cuando las células entran en mitosis, pero debe permanecer activo hasta que todos los cromosomas se han unido al huso mitótico.

3.4 La salida de mitosis

La anafase, es el punto de no retorno en la mitosis. Después de que las cromátidas se han separado, la célula se dirige a la salida de la mitosis porque los niveles de ciclinaB-Cdk caen por bajo del nivel requerido para mantener la mitosis, y las células tienen que coordinar la reordenación de su arquitectura subcelular para volver al estado de interfase. Aquí la proteólisis mediada por APC/C juega también un papel en degradar Plk1 y Aurora quinasas (90) (91), pero la mayor parte es jugado por las fosfatasas. En *S. cerevisiae* la fosfatasa CDC14 se activa cuando los niveles de ciclina Cdk caen por debajo del umbral lo que permite a Cdc14 liberarse de un inhibidor nuclear (92). En la mayoría de los sistemas los complejos de PP1 y PP2A son los que controlan la anafase y la salida de mitosis (93).

En resumen, las transiciones entre diferentes fases del ciclo celular están gobernadas por modificaciones postraduccionales de proteínas. La fosforilación de proteínas es la modificación post-traducciona l más importante con tres cuartos del proteoma humano fosforilado. La mayor ocupación de sitios de fosforilación se observa en la mitosis en la que la transcripción y la traducción se encuentran reprimidas. La entrada en mitosis, su progresión y salida están reguladas por la fosforilación dinámica de proteínas del ciclo celular.

3.5 Sistemas de regulación y control

La mitosis, al tratarse de un proceso celular que conlleva una gran reorganización está sujeto a múltiples mecanismos de regulación y puntos de control.

Uno de ellos se produce cuando se detectan cinetocoros desocupados y se activa el punto de control del ensamblaje del huso (SAC). Este sistema de regulación detiene la progresión a través de la mitosis y le da a la célula tiempo adicional para que los cinetocoros se ocupen adecuadamente. Por lo tanto, los cinetocoros desocupados activan un punto de control que retroalimenta para disminuir el número de cinetocoros desocupados. Este mecanismo detiene el progreso de la mitosis y permite a la célula el tiempo necesario para que todos los cinetocoros se ocupen o por el contrario la mitosis se detenga. Sus componentes moleculares constituyen una ruta de señalización por la que los cinetocoros no unidos reclutan proteínas de las familias MAD y BUB las cuales activan un inhibidor del APC/C que impide la proteólisis de ciclina y detiene la mitosis. Este sistema presenta características de un circuito de retroalimentación negativo entre CDK1 y APC/C que impulsa oscilaciones en la abundancia de ciclina y la actividad de Cdk1.

Análogamente, en la entrada de mitosis, la duplicación incompleta de ADN u otros procesos como retraso en el crecimiento o el estrés, impiden el comienzo de la mitosis utilizando un mecanismo de control situado en la entrada. Este sistema de regulación se centra en la activación de Cdk1 al inicio de la mitosis y la inactivación de Cdk1 durante la salida de mitosis. En la mitosis Cdk1 enciende su activador Cdc25 y apaga su inactivador Wee1. Al salir de la mitosis Cdc 25 se apaga y wee1 se vuelve a encender.

En la Biología de Sistemas estos bucles constituyen un mecanismo conocido como un disparador biestable. A bajas concentraciones de ciclina B1, solo es posible un único estado estacionario de baja actividad de Cdk1. A altas concentraciones también es posible un solo estado estacionario de alta actividad de cdk1. A concentraciones intermedias hay dos posibles estados estacionarios uno con bajos niveles y otro con altos niveles. El sistema se dice así que es biestable.

Estas consideraciones dan apoyo experimental a que el sistema Cdk1/Cdc25/Wee1 funcione como un interruptor. La histéresis en la respuesta contribuye a la irreversibilidad de la transición G2/M. Es decir, a que las transiciones del ciclo celular sean unidireccionales.

Otra consecuencia es que los diferentes niveles de estabilidad de Cdk1 configuran la interfase como distinta de la fase M y que en este sentido las fases discretas del ciclo celular pueden ser como los distintos destinos celulares que surgen durante el proceso del desarrollo embrionario.

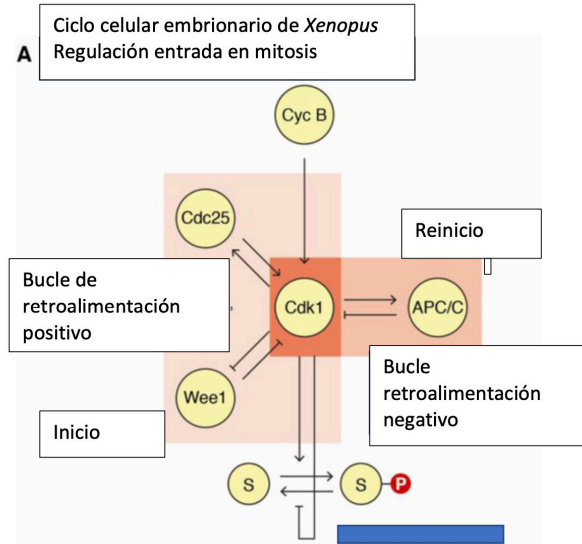


Figura 3. Vista esquemática de los sistemas de control para el ciclo celular embrionario de *Xenopus laevis*.

3.6 Fosforilación dinámica y coordinación entre protein quinasas y fosfatasas

La entrada en la mitosis se caracteriza a menudo como un aumento dramático en la fosforilación que necesita ser revertida por una desfosforilación “masiva” para permitir que las células salgan de la mitosis. En general, estos cambios en la fosforilación de proteínas van acompañados de un aumento en la actividad quinasa, la más importante la actividad Cdk1, y una reducción de las actividades fosfatasa PP1 y PP2A al comienzo de la mitosis, seguida de una inversión de las actividades respectivas a medida que las células comienzan a salir de la mitosis. Sin embargo, la regulación de la señalización de fosforilación en todas las fases de la mitosis es dinámica y requiere la coordinación de las actividades de la quinasa y fosfatasas opuestas de una manera temporal y espacial específica para garantizar una progresión ordenada y precisa a través de la mitosis para generar células hijas idénticas (Fig. 4).

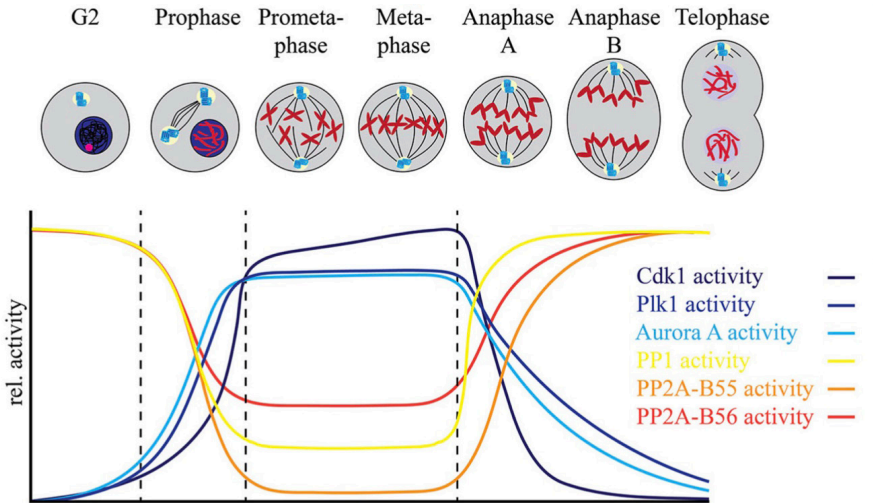


Figura 4. Actividad relativa de Quinasas y fosfatasa durante la mitosis (adaptada de Nasa I. et al. *Front.in Cell and Dev. Biol.* 2018)

La evidencia de una amplia regulación de la actividad de Protein fosfatasa (PP) durante la mitosis proviene de avances recientes en la proteómica basada en espectrometría de masas que han permitido el análisis global del fosfoproteoma (94) (95). En combinación con inhibidores de quinasa, estos estudios han revelado muchas relaciones quinasa-sustrato y han proporcionado información sobre las vías de señalización de fosforilación complejas (96) (97).

Una estrategia experimental común para estos experimentos es la comparación cuantitativa de dos poblaciones de células: una tratada con inhibidor de quinasa (durante un corto período de tiempo para evitar cambios en la abundancia de proteínas), y la otra tratada como control, seguida de la comparación de los cambios dinámicos de ocupación del sitio de fosforilación entre ellos por espectrometría de masas. Tras el cese de la actividad quinasa, la actividad de una proteína fosfatasa opuesta es necesaria para reducir la ocupación del sitio de fosforilación. En otras palabras, en ausencia de una fosfatasa que contrarreste, la ocupación del sitio de fosforilación no cambiará incluso en presencia de inhibidores que se dirijan a la quinasa responsable. Cuando se realiza en la mitosis o en la detención mitótica inducida por estabilizadores de microtúbulos como taxol o desestabilizadores como el nocodazol, esta estrategia ha llevado al enlace de cientos de sitios

de fosforilación a quinasas mitóticas específicas, lo que sugiere que las proteínas fosfatasa son realmente activas durante la mitosis. Una pequeña actividad de protein fosfatasa, detiene las células en la mitosis e impide su salida, mientras que demasiada actividad de fosfatasa da como resultado defectos mitóticos (100). Esto lleva a las siguientes preguntas: ¿Cómo logra una célula el equilibrio perfecto de estas actividades opuestas? ¿Y cómo se regulan las actividades de la proteína quinasa y la fosfatasa entre sí y en sus sustratos compartidos para lograr el equilibrio de la fosforilación?

En el caso de PP1, Cdk1/ciclina B fosforila Thr-320 cerca del extremo carboxilo de PP1 lo que tiene un efecto inhibitor sobre la actividad catalítica de PP1 durante la mitosis (102)). La reversión de esta fosforilación inhibitor se logra mediante la autocatálisis de PP1. Una pequeña disminución en la actividad de Cdk1/ciclina B en la transición metafase-anafase es suficiente para que PP1 se autodefosforile en Thr-320 (78). Además de la modificación postraduccional directa de la subunidad catalítica, Cdk1 / ciclina B también regula la actividad de PP1 fosforilando las subunidades reguladoras de PP1 y evitando su unión a la subunidad catalítica. Esto es especialmente importante para la regulación local de la actividad de PP1. Por ejemplo, Cdk1/ciclina B fosforila Repo-Man, evitando que PP1 se dirija a los cromosomas antes de la transición metafase-anafase (103). La actividad de PP1 también se modula a través de la unión de pequeñas proteínas inhibitoras termoestables llamadas Inhibidor 1 y 2 (104). La fosforilación del inhibidor-1 y el inhibidor-2 por PKA y Cdk1/ciclina B, respectivamente, regula su unión a la subunidad catalítica de PP1. Estos mecanismos explican la reducción, pero no la inhibición completa de la actividad de PP1 en la mitosis (105).

La inhibición dependiente de Cdk1 / ciclina B del complejo PP2A-B55 es indirecta. Tras la entrada mitótica, Cdk1/ciclina B fosforila y activa la quinasa Gwl, que a su vez inhibe la actividad de PP2A-B55 (106). Gwl no inhibe directamente la actividad PP2A-B55, pero fosforila dos proteínas homólogas termoestables ENSA (α -endosulfina) y ARPP19 (fosfoproteína 19 regulada por monofosfato de adenosina cíclico) en un residuo de serina altamente conservado. Son las formas fosforiladas de ENSA y ARPP19 las que se unen e inhiben específicamente PP2A-B55.

Finalmente, Cdk1/ciclina B fosforila el complejo PP4 heterotrimérico, reduciendo así la actividad de PP4 en la mitosis (107). Se sabe que esta reducción en la

actividad de PP4 durante la mitosis es esencial para mantener la γ -tubulina en los centrosomas fosforilada, lo que mejora la formación del huso mitótico.

La visión tradicional de la fosforilación de proteínas es que las quinasas y las fosfatasas actúan de manera antagónica para activar o desactivar las señales individuales. Es una imagen que describe con precisión el funcionamiento interno de todas las redes de fosforilación de proteínas en su nivel más fundamental esto es el de una molécula individual. Lo cierto es, que las células utilizan esta reacción de fosforilación reversible como bloque de construcción básico, como un interruptor binario, para generar respuestas que son mucho más complejas. Esta complejidad se debe a que cada molécula individual está presente a menudo en miles de copias idénticas que deben trabajar juntos en tiempo y espacio para definir colectivamente la respuesta.

Uno se puede imaginar entonces que cada copia (o molécula) es como una luz separada y luego imaginar los diferentes patrones o intensidades de luz a que podrían dar lugar dentro de la célula, y cómo esto podría cambiar en el tiempo. Pulsos, ondas, patrones de luz parpadeando, y gradientes de luz estallando en algunos lugares y en determinados momentos. Dependiendo de lo que se requiera la señales quinasas y fosfatasas pueden trabajar en oposición parpadeando luz de encendido y apagado (on-off), pero también funcionar juntas para dirigir la imagen más compleja definiendo flujos de luz.

En cada una de estas situaciones, quinasas y fosfatasas trabajan juntas para definir la señal y producir el tipo correcto de respuesta. Esto desafía la creencia común de que las fosfatasas desconectan principalmente las salidas y sugiere que desempeñan un papel mucho más activo en la transducción de señales intracelulares (108).

Es tentador especular que los otros tipos de modificaciones reversibles post-traduccionales, de manera similar, podrían depender de la correulación de parejas de enzimas que se ven tradicionalmente como antagonistas. La acetilación de histonas, por ejemplo, debe regularse estrictamente en el tiempo y el espacio para controlar la expresión génica. Esto podría requerir coordinación entre histonas acetiltransferasas (HAT) y desacetilasas (HDAC) (109), o entre pares de enzimas alternativos que pueden correular la actividad de HAT y HDAC (110). Será muy interesante determinar cuán importante es la existencia de co-regulación antagónica para estos modos alternativos de señalización.

4. INESTABILIDAD CROMOSÓMICA, ANEUPLOIDIA Y CÁNCER

Los errores que se producen en el proceso bioquímico de la mitosis conducen a la generación de células hijas con un número de cromosomas anormal. Es una característica que se conoce como aneuploidía. Casi todas las aneuploidías que se producen por errores en la meiosis o durante el desarrollo embrionario temprano no son viables en humanos, con la sola excepción de la trisomía 21 (síndrome de Down). Sin embargo, los errores que dan lugar a la aneuploidía más tarde en la vida se han relacionado con el envejecimiento y la formación de tumores y hay que tener en cuenta que cada día millones de células de nuestro cuerpo se dividen para permitir el crecimiento y reemplazar las células perdidas o dañadas en nuestros tejidos.

La aneuploidía es una característica muy frecuente en el cáncer, pues aparece en casi el 70% de los tumores humanos sólidos. Además de alteraciones en el número de cromosomas las células tumorales muestran frecuentemente alteraciones estructurales en los cromosomas como deleciones, amplificaciones y traslocaciones, que se conocen genéricamente como inestabilidad cromosómica (INC).

A principios del siglo XX, Theodor Boveri, biólogo alemán, postuló que la aneuploidía, podía ser una fuerza impulsora de la transformación celular y la génesis tumoral (111). Hanahan y Weinberg, en su artículo de referencia de 2011, sobre las señales de identidad en el cáncer (112) identificaron la inestabilidad del genoma como una característica del cáncer. La hipótesis detrás de esta calificación, es que la inestabilidad del genoma puede conducir a la adquisición de un fenotipo mutador, que aumentaría la probabilidad de que una célula adquiriera características cancerosas. (113). A favor de esta idea se encuentran las observaciones de que la gran mayoría de las neoplasias malignas son aneuploides, que múltiples modelos de ratones aneuploides están predispuestos al cáncer (114) y que la aneuploidía conduce a la pérdida de heterocigosidad de genes supresores de tumor (115). En contra de este modelo, se encontrarían observaciones de que la aneuploidía retrasa la inmortalización espontánea (140) y provoca una variedad de respuestas antitumorales, que incluyen el crecimiento y la detención del ciclo celular (116), apoptosis (117), catástrofe mitótica (118) y senescencia (119). Además, hay modelos de ratones aneuploides que no son propensos al cáncer. Por lo tanto, si la aneuploidía es una causa o una consecuencia de la transformación celular y si la aneuploidía promueve o suprime la tumorigénesis eran hasta hace unos años importantes preguntas sin respuesta.

Recientes interpretaciones permiten entender por qué la aneuploidía podría tanto facilitar como inhibir la aparición de tumores, es la teoría de ganancia/pérdida de cromosomas (Fig. 5). Este modelo reconoce el término aneuploidía como un término genérico que incluye cualquier célula somática con un cariotipo no diploide. En consecuencia, es probable que las células con pérdida neta de cromosomas y aquellas con ganancia neta de cromosomas den lugar a respuestas celulares diferentes. Es decir que si bien la inestabilidad cromosómica facilita, a través de la pérdida de genes supresores de tumor, la formación de un tumor, la ganancia de cromosomas por otro lado, sería la causa los fenómenos de proteotoxicidad como detención del ciclo celular, apoptosis, catástrofe mitótica o senescencia de las células tumorales y actuaría como un mecanismo de detención de la proliferación celular. Esta teoría estaría respaldada por el hallazgo de que las células cancerosas tienden a perder cromosomas en lugar de ganarlos (120).

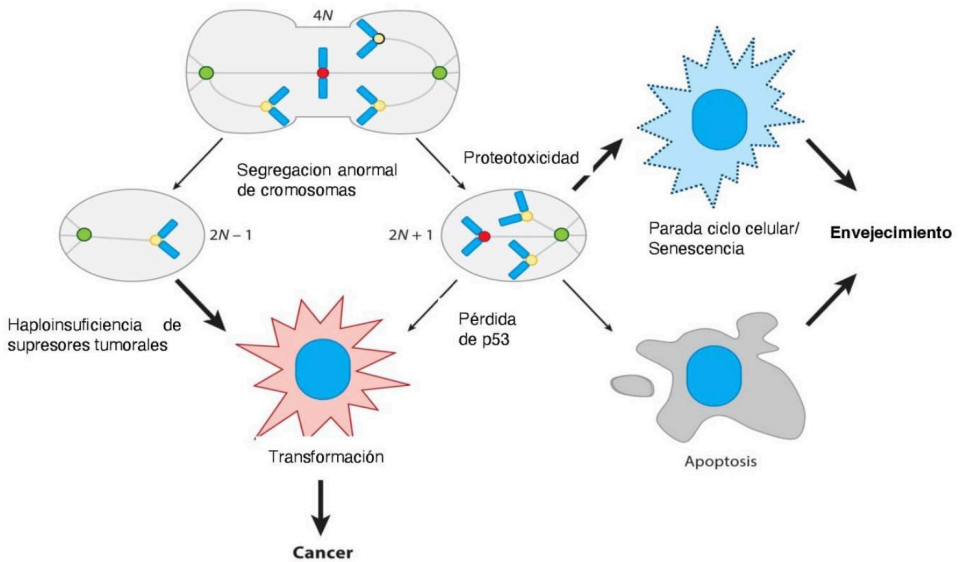


Figura 5. Diferentes efectos de pérdida/ ganancia de cromosoma en aneuploidía(a-
daptado de (113).

La opinión generalizada, es que la inestabilidad cromosómica (INC) es un facilitador clave de la génesis tumoral. Se puede incluso establecer una analogía con la relación existente entre el consumo de cigarrillos y el cáncer de pulmón. Así, está generalmente reconocido que fumar cigarrillos provoca cáncer de pulmón. Esto se basa en la observación de que los fumadores tienen hasta 25 veces más probabilidades de desarrollar cáncer de pulmón que los no fumadores. Sin embargo, no todas las personas con antecedentes de tabaquismo desarrollan cáncer de pulmón. Muchos fumadores padecen en cambio, otras enfermedades como enfermedad pulmonar crónica, enfermedades cardíacas, enfermedades vasculares, en tanto que otros conservan una buena salud hasta la vejez. Sin embargo, fumar se considera el principal factor de riesgo para el cáncer de pulmón.

Sobre la base de este paralelismo, se puede concluir que la INC es un facilitador o factor de riesgo para el desarrollo del cáncer. Así como la gran mayoría de los casos de cáncer de pulmón tienen lugar en fumadores, la gran mayoría de los tumores muestran inestabilidad cromosómica y aneuploidía. Del mismo modo que solo un subconjunto de fumadores desarrolla cáncer de pulmón, análogamente, solo un subconjunto de ratones modelo aneuploides están predispuestos al cáncer. Y finalmente, así como los fumadores están predispuestos a una serie de problemas graves de salud que son heterogéneos clínicamente, la aneuploidía también da como resultado destinos celulares divergentes que son fisiológicamente heterogéneos.

4.1 Un vínculo inesperado entre la aneuploidía y el envejecimiento

Con el objetivo de probar esta teoría, se generó una cohorte de ratones con niveles bajos de BubR1 (Bub1bH/H) y aneuploidía progresiva, para determinar su susceptibilidad a formar tumores espontáneos e inducidos por carcinógenos (121). Inesperadamente, los ratones Bub1bH/H mostraron varios fenotipos de envejecimiento prematuro que incluyen cataratas, cifosis, cicatrización de heridas deteriorada, retraso del crecimiento y pérdida de grasa subdérmica, con solo tres meses de edad. Además, los ratones Bub1bH/H tenían una esperanza de vida notablemente reducida, con una mediana de supervivencia de seis meses.

Menos de dos años después de la descripción inicial, también se demostró que un segundo modelo de ratón propenso a la aneuploidía, doblemente haploinsuficiente para Bub3 y Rae1, mostraba características progeroides similares (122).

Estos estudios sugieren una relación causal entre INC y el envejecimiento. La relación, se fortaleció más tarde cuando se descubrió que la sobreexpresión de BubR1 en ratones de tipo salvaje impedía la aneuploidía relacionada con la edad, protegía contra la tumorigénesis, retrasaba múltiples fenotipos de envejecimiento y prolongaba la vida útil (123).

La teoría de la aneuploidía y el envejecimiento también ha obtenido un impulso significativo con la descripción clínica de la aneuploidía en mosaico, un síndrome humano extremadamente raro caracterizado por un mosaicismo cariotípico generalizado, aparición temprana de cataratas y cáncer, retraso del crecimiento y una vida más corta (124).

A pesar de todos estos hallazgos, no hay hasta el momento una evidencia indiscutible que demuestre que la aneuploidía es un impulsor o facilitador del envejecimiento.

5. OBSERVACIONES FINALES Y DIRECCIONES FUTURAS

La combinación de la biología celular, la genética y la bioquímica han permitido grandes avances en la comprensión de los mecanismos moleculares y bioquímicos que subyacen a la mitosis. Los avances obtenidos han revelado también circuitos de regulación que mejoran el conocimiento de la ciclo celular.

Además, los paradigmas actuales sugieren que la incapacidad para separar de manera precisa y reproducible la información genómica después de su duplicación, facilita la transformación maligna y el envejecimiento. La próxima frontera en el campo es traducir este conocimiento en soluciones clínicamente relevantes para los pacientes.

Podemos sentirnos alentados por el hecho de que algunas de las terapias contra el cáncer más difundidas y exitosas son aquellas que se dirigen directamente a la mitosis, a saber, los alcaloides de la vinca como Vincristina, y los taxanos como Paclitaxel.

La aneuploidía puede, al reconfigurar el metabolismo de una célula, ser una manera de aumentar la susceptibilidad a determinados agentes farmacológicos.

La INC en las células cancerosas puede abrir también una ventana terapéutica para activar los mecanismos anticancerígenos intrínsecos de la célula (p. ej., apoptosis, senescencia) y dejar intactas las células no malignas

Considerando que un gran número de proteínas esenciales y sus complejos funcionales durante la mitosis se conoce ahora y que su número sigue aumentando, hay que reconocer que todavía se entiende poco a nivel atómico.

Asimismo, se sabe poco sobre la alteración de la mitosis bajo estrés nutricional y ambiental. Los patrones de la mitosis pueden cambiar en gran medida bajo diferentes condiciones fisiológicas, nutricionales y senescentes.

Los estudios comparativos de la mitosis entre células y células madre son de interés como un posible escenario para el origen de propiedades asimétricas entre células hijas, que son características esenciales de la diferenciación celular.

Al final, hay que destacar, la importancia de las variaciones evolutivas en la mitosis, es decir cómo cambios en la mitosis, pueden ser ricos recursos de la diversificación de los organismos.

He dicho.

Madrid, 19 de enero de 2023.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Nurse, P. ¿Qué es la vida? Ed. Planeta. Barcelona. 2020.
2. Monod, J. El azar y la necesidad. Ed. Barral Editores. Barcelona.1977.
3. Paweletz N. 2001. Walther Flemming: Pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 72 – 75.
4. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* 79: 137–158.
5. Rieder CL, Hard R. 1990. Newt lung epithelial cells: Cultivation, use, and advantages for biomedical research. *Int Rev Cytol* 122: 153–220.
6. Li R, Havel C, Watson JA, Murray AW. 1993. The mitotic feedback control gene MAD2 encodes the α -subunit of α -prenyltransferase. *Nature* 366: 82–84.
7. Rieder CL, Alexander SP. 1990. Kinetochores are transported poleward along a single astral microtubule during chromosome attachment to the spindle in newt lung cells. *J Cell Biol* 110: 81–95.
8. Johnson RT, Rao PN. 1970. Mammalian cell fusion: Induction of premature chromosome condensation in inter- phase nuclei. *Nature* 226: 717–722.
9. Rao PN, Johnson RT. 1970. Mammalian cell fusion: Studies on regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* 225: 159 – 164.
10. Hunt T.2004.The discovery of cyclin (I).*Cell*116(2Suppl): S63–S64, 1 p following S65.
11. Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ. 1974. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183: 46 – 51.

12. Mitchison JM. 1957. The growth of single cells: 1. *Schizosaccharomyces pombe*. *Exp Cell Res* 13: 244–262.
13. Leupold U. 1958. Studies on recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 23: 161–170.
14. Fantes P, Nurse P. 1977. Control of cell size at division in fission yeast by a growth-modulated size control over nuclear division. *Exp Cell Res* 107: 377–386.
15. Nurse P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344: 503–508.
16. Toda T, Yamamoto M, Yanagida M. 1981. Sequential alterations in the nuclear chromatin region during mitosis of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Video fluorescence microscopy of synchronously growing wild type and cold-sensitive *cdc* mutants by using a DNA-binding fluorescent probe. *J Cell Sci* 52: 271–287.
17. Hirota K, Miyoshi T, Kugou K, Hoffman CS, Shibata T, Ohta K. 2008. Stepwise chromatin remodelling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs. *Nature* 456: 130 – 134.
18. Masui Y, Markert CL. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 177: 129–145.
19. Lohka MJ, Hayes MK, Maller JL. 1988. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci* 85: 3009–3013.
20. Gautier J, Norbury C, Lohka M, Nurse P, Maller J. 1988. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Cell* 54: 433–439.
21. Sudakin V, Ganoth D, Dahan A, Heller H, Hershko J, Luca FC, Ruderman JV, Hershko A. 1995. The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell* 6: 185–197.

22. Peters JM, King RW, Hoog C, Kirschner MW. 1996. Identification of BIME as a subunit of the anaphase-promoting complex. *Science* 274: 1199–1201.
23. Hershko A. 1999. Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin B. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 1571–1575; discussion 1575–1576.
24. 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.
25. Yamamoto A, Guacci V, Koshland D. 1996. Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J Cell Biol* 133: 99 – 110.
26. Hinnen A, Hicks JB, Fink GR. 1978. Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci* 75: 1929–1933.
27. Clarke L, Carbon J. 1980a. Isolation of the centromere linked CDC10 gene by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci* 77: 2173–2177.
28. Clarke L, Carbon J. 1980b. Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature* 287: 504–509.
29. Chikashige Y, Kinoshita N, Nakaseko Y, Matsumoto T, Murakami S, Niwa O, Yanagida M. 1989. Composite motifs and repeat symmetry in *S. pombe* centromeres: Direct analysis by integration of NotI restriction sites. *Cell* 57: 739 – 751.
30. Hahnenberger KM, Carbon J, Clarke L. 1991. Identification of DNA regions required for mitotic and meiotic functions within the centromere of *Schizosaccharomyces pombe* chromosome I. *Mol Cell Biol* 11: 2206–2215.
31. Niwa O, Matsumoto T, Chikashige Y, Yanagida M. 1989. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* minichromosome deletion derivatives and a functional allocation of their centromere. *EMBO J* 8: 3045–3052.

32. Takahashi K, Murakami S, Chikashige Y, Funabiki H, Niwa O, Yanagida M. 1992. A low copy number central sequence with strict symmetry and unusual chromatin structure in fission yeast centromere. *Mol Biol Cell* 3: 819 – 835.
33. Nishimoto T, Eilen E, Basilico C. 1978. Premature of chromosome condensation in a ts DNA-mutant of BHK cells. *Cell* 15: 475–483.
34. Yanagida M. 2005. Basic mechanism of eukaryotic chromosome segregation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 609 – 621.
35. Uemura T, Ohkura H, Adachi Y, Morino K, Shiozaki K, Yanagida M. 1987. DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell* 50: 917–925.
36. Hayashi T, Fujita Y, Iwasaki O, Adachi Y, Takahashi K, Yanagida M. 2004. Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell* 118: 715–729.
37. Wang JC. 1991. DNA topoisomerases: Why so many? *J Biol Chem* 266: 6659–6662.
38. Holm C, Meeks Wagner DW, Fangman WL, Botstein D. 1986. A rapid, efficient method for isolating DNA from yeast. *Gene* 42: 169–173.
39. Glover DM. 1989. Mitosis in *Drosophila*. *J Cell Sci* 92: 137 – 147
40. St Johnston D, Nusslein-Volhard C. 1992. The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68: 201 – 219.
41. Sunkel CE, Glover DM. 1988. Polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci* 89: 25–38.
42. Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA, Parry H. 1995. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 81: 95 – 105.

43. Lane HA, Nigg EA. 1996. Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol* 135: 1701–1713.
44. Kumagai A, Dunphy WG. 1996. Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science* 273: 1377–1380.
45. Biggins S, Murray AW. 2001. The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev* 15: 3118–3129
46. Miyazaki WY, Orr-Weaver TL. 1994. Sister-chromatid cohesion in mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet* 28: 167 – 187.
47. Cheeseman IM. 2014. The kinetochore. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6: a015826.
48. Hirano T. 2015. Chromosome dynamics during mitosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*
49. Reber S, Hyman AA. 2015. Emergent properties of the metaphase spindle. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*
50. Westhorpe FG, Tighe A, Lara-Gonzalez P, Taylor SS. 2011. p31^{comet}-mediated extraction of Mad2 from the MCC promotes efficient mitotic exit. *J Cell Sci* 124: 3905 – 3916.
51. D’Avino PP, Giansanti MG, Petronczki M. 2015. Cytokinesis in animal cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* doi: 10.1101/cshperspect.a015834.
52. Pines J, Hagan I. 2011. The Renaissance or the cuckoo clock. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366: 3625–3634.
53. Patra D, Wang SX, Kumagai A, Dunphy WG. 1999. The *Xenopus* Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G2/M regulators. *J Biol Chem* 274: 36839 – 36842.

54. Brown NR, Noble ME, Endicott JA, Garman EF, Wakatsuki S, Mitchell E, Rasmussen B, Hunt T, Johnson LN. 1995. The crystal structure of cyclin A. *Structure* 3: 1235 – 1247.
55. Russo AA, Jeffrey PD, Pavletich NP. 1996. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol* 3: 696–700.
56. Pavletich NP. 1999. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: Structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287: 821–828.
57. Coudreuse D, Nurse P. 2010. Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature* 468: 1074–1079.
58. Su TT, Sprenger F, DiGregorio PJ, Campbell SD, O’Farrell PH. 1998. Exit from mitosis in *Drosophila* syncytial embryos requires proteolysis and cyclin degradation and is associated with localized dephosphorylation. *Genes Dev* 12: 1495–1503.
59. McClelland ML, Farrell JA, O’Farrell PH. 2009. Influence of cyclin type and dose on mitotic entry and progression in the early *Drosophila* embryo. *J Cell Biol* 184: 639–646.
60. Atherton-Fessler S, Parker LL, Geahlen RL, Piwnicka-Worms H. 1993. Mechanisms of p34cdc2 regulation. *Mol Cell Biol* 13: 1675–1685.
61. Francis D. 2011. A commentary on the G₂/M transition of the plant cell cycle. *Ann Bot* 107: 1065–1070.
62. Petersen J, Nurse P. 2007. TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nat Cell Biol* 9: 1263–1272.
63. Atkin J, Halova L, Ferguson J, Hitchin JR, Lichawska-Cieslar A, Jordan AM, Pines J, Wellbrock C, Petersen J. 2014. Torin1-mediated TOR kinase inhibition reduces Wee1 levels and advances mitotic commitment in fission yeast and HeLa cells. *J Cell Sci* 127: 1346–1356.

64. Laoukili J, Kooistra MR, Bras A, Kauw J, Kerkhoven RM, Morrison A, Clevers H, Medema RH. 2005. FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nat Cell Biol* 7: 126–136.
65. Grallert A, Patel A, Tallada VA, Chan KY, Bagley S, Krapp A, Simanis V, Hagan IM. 2013. Centrosomal MPF triggers the mitotic and morphogenetic switches of fission yeast. *Nat Cell Biol* 15: 88–95.
66. Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J. 2003. Active cyclin B1–Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* 5: 143–148.
67. Nigg EA. 1991. The substrates of the cdc2 kinase. *Semin Cell Biol* 2: 261–270.
68. Errico A, Deshmukh K, Tanaka Y, Pozniakovsky A, Hunt T. 2010. Identification of substrates for cyclin dependent kinases. *Adv Enzyme Regul* 50: 375–399.
69. Bollen M, Gerlich DW, Lesage B. 2009. Mitotic phosphatases: From entry guards to exit guides. *Trends Cell Biol* 19: 531–541.
70. Kinoshita N, Ohkura H, Yanagida M. 1990. Distinct, essential roles of type 1 and 2A protein phosphatases in the control of the fission yeast cell division cycle. *Cell* 63: 405 – 415.
71. Chen F, Archambault V, Kar A, Lio P, D’Avino PP, Sinka R, Lilley K, Laue ED, Deak P, Capalbo L, et al. 2007. Multiple protein phosphatases are required for mitosis in *Drosophila*. *Curr Biol* 17: 293–303.
72. D’Amours D, Amon A. 2004. At the interface between signaling and executing anaphase—Cdc14 and the FEAR network. *Genes Dev* 18: 2581–2595.
73. Mochida S, Ieko S, Gannon J, Hunt T. 2009. Regulated activity of PP2A-B55 is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J* 28: 2777–2785.

74. Blake-Hodek KA, Williams BC, Zhao Y, Castilho PV, Chen W, Mao Y, Yamamoto TM, Goldberg ML. 2012. Determinants for activation of the atypical AGC kinase Greatwall during M phase entry. *Mol Cell Biol* 32: 1337–1353.
75. Virshup DM, Shenolikar S. 2009. From promiscuity to precision: Protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* 33: 537 – 545.
76. Bollen M, Peti W, Ragusa MJ, Beullens M. 2010. The extended PP1 toolkit: Designed to create specificity. *Trends Biochem Sci* 35: 450–458.
77. Heroes E, Lesage B, Gornemann J, Beullens M, Van Meervelt L, Bollen M. 2013. The PP1 binding code: A molecular- lego strategy that governs specificity. *FEBS J* 280: 584– 595
78. Wu JQ, Guo JY, Tang W, Yang C-S, Freel CD, Chen C, Nairn AC, Kornbluth S. 2009. PP1-mediated dephosphorylation of phosphoproteins at mitotic exit is controlled by inhibitor-1 and PP1 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 11: 644 – 651.
79. Schockel L, Mockel M, Mayer B, Boos D, Stemmann O. 2011. Cleavage of cohesin rings coordinates the separation of centrioles and chromatids. *Nat Cell Biol* 13: 966 – 972.
80. Hershko A, Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425–479.
81. Pickart CM. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70: 503–533.
82. Ciechanover A. 1994. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79: 13–21.
83. Barford D. 2011. Structural insights into anaphase-promoting complex function and mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366: 3605–3624.

84. Pines J. 2006. Mitosis: A matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends Cell Biol* 16: 55–63.
85. Rieder CL, Cole RW, 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: 941–948.
86. Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG, Taylor SS. 2012. The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* 22: R966–R980.
87. Sudakin V, Chan GK, Yen TJ. 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* 154:925–936.
88. De Antoni A, Pearson CG, Cimini D, Canman JC, Sala V, Nezi L, Mapelli M, Sironi L, Faretta M, Salmon ED, et al. 2005. The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* 15: 214–225.
89. Huang X, Andreu-Vieyra CV, York JP, Hatcher R, Lu T, Matzuk MM, Zhang P. 2008. Inhibitory phosphorylation of separase is essential for genome stability and viability of murine embryonic germ cells. *PLoS Biol* 6: e15.
90. Lindon C, Pines J. 2004. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J Cell Biol* 164: 233–241.
91. Floyd S, Pines J, Lindon C. 2008. APC/C Cdh1 targets aurora kinase to control reorganization of the mitotic spindle at anaphase. *Curr Biol* 18: 1649–1658.
92. Rock JM, Amon A. 2009. The FEAR network. *Curr Biol* 19: R1063 – R1068.
93. Wurzenberger C, Held M, Lampson MA, Poser I, Hyman AA, Gerlich DW. 2012. Sds22 and Repo-Man stabilize chromosome segregation by counteracting Aurora B on anaphase kinetochores. *J Cell Biol* 198: 173–183.
94. Olsen, J. V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M. L., Mann,

- M., et al. (2010). Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci. Signal* 3:ra3. doi: 10.1126/scisignal.2000475
95. Oppermann, F. S., Grundner-Culemann, K., Kumar, C., Gruss, O. J., Jallepalli, P. V., and Daub, H. (2012). Combination of chemical genetics and phosphoproteomics for kinase signaling analysis enables confident identification of cellular downstream targets. *Mol. Cell. Proteomics* 11: O111.012351. doi: 10.1074/mcp.O111.012351
 96. Petrone, A., Adamo, M. E., Cheng, C., and Kettenbach, A. N. (2016). Identification of candidate cyclin-dependent kinase 1 (cdk1) substrates in mitosis by quantitative phosphoproteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 15, 2448–2461. doi: 10.1074/mcp.M116.059394
 97. Maciejowski, J., Drechsler, H., Grundner-Culemann, K., Ballister, E. R., Rodriguez-Rodriguez, J. A., Jallepalli, P. V., et al. (2017). Mps1 regulates kinetochore-microtubule attachment stability via the ska complex to ensure error-free chromosome segregation. *Dev. Cell* 41, 143–156.e6. doi: 10.1016/j.devcel.2017.03.025
 98. Llorian, M., Beullens, M., Andres, I., Ortiz, J. M., and Bollen, M. (2004). SIPP1, a novel pre-mRNA splicing factor and interactor of protein phosphatase-1. *Biochem J.* 378(Pt 1): 229-238
 99. Llorian, M., Beullens, M., Lesage, B., Nicolaescu, E., Beke, L., Landuyt, W., Ortiz, J. M., and Bollen, M. (2005). Nucleocytoplasmic shuttling of the splicing factor SIPP1. *J Biol Chem.* 280(46): 38862-38869
 100. Sangrador, A., Andres, I., Eguiraun, A., Lorenzo, M. L., and Ortiz, J. M. (1998). Growth arrest of *Schizosaccharomyces pombe* following overexpression of mouse type 1 protein phosphatases. *Mol Gen Genet.* 259(5): 449-456
 101. Alvarez- Tabarés, I., Grallert, A., Ortiz, J. M., and Hagan, I. (2007). Protein phosphatase 1 in mitosis, endocytosis and morphogenesis of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* 120 :3589- 3601

102. Dohadwala, M., da Cruz e Silva, E. F., Hall, F. L., Williams, R. T., Carbonaro-Hall, D. A., Berndt, N., et al. (1994). Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 6408–6412. doi: 10.1073/pnas.91.14.6408
103. Vagnarelli, P., Ribeiro, S., Sennels, L., Sanchez-Pulido, L., de Lima Alves, F., Verheyen, T., et al. (2011). Repo-Man coordinates chromosomal reorganization with nuclear envelope reassembly during mitotic exit. *Dev. Cell* 21, 328–342. doi: 10.1016/j.devcel.2011.06.020
104. Brautigan, D. L. (2013). Protein Ser/Thr phosphatases—the ugly ducklings of cell signalling. *FEBS J.* 280, 324–345. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08609.x
105. Ceulemans, H., and Bollen, M. (2004). Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol. Rev.* 84, 1–39. doi: 10.1152/physrev.00013.2003
106. Castilho, P. V., Williams, B. C., Mochida, S., Zhao, Y., and Goldberg, M. L. (2009). The M phase kinase Greatwall (Gwl) promotes inactivation of PP2A/B55delta, a phosphatase directed against CDK phosphosites. *Mol. Biol. Cell* 20, 4777–4789. doi: 10.1091/mbc.E09-07-0643
107. Voss, M., Campbell, K., Saranzewa, N., Campbell, D. G., Hastie, C. J., Cohen, P. T., et al. (2013). Protein phosphatase 4 is phosphorylated and inactivated by Cdk in response to spindle toxins and interacts with gamma-tubulin. *Cell Cycle* 12, 2876–2887. doi: 10.4161/cc.25919
108. Gelens, L., Qian, J., Bollen, M., & Saurin, A. T. (2018). The Importance of Kinase-Phosphatase Integration: Lessons from Mitosis. *Trends in Cell Biology*, 28(1), 6-21. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.09.005>
109. Winter, S. and Fischle, W. (2010). Epigenetic markers and their cross-talk. *Essays Biochem.* 48, 45–61.
110. Segre, C. V. and Chiocca, S. (2011). Regulating the regulators: the post-translational code of class I HDAC1 and HDAC2. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 690848.

111. Boveri, T. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. In: Harris, Henry, translator. *J Cell Sci.* Vol. 121. 2008. p. 1-84.
112. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144:646–74. [PubMed: 21376230]
113. Ricke RM, van Ree JH, van Deursen JM. Whole chromosome instability and cancer: a complex relationship. *Trends Genet.* 2008; 24:457–66.
114. Ricke RM, van Ree JH, van Deursen JM. Whole chromosome instability and cancer: a complex relationship. *Trends Genet.* 2008; 24:457–66.
115. Baker DJ, Jin F, Jeganathan KB, van Deursen JM. Whole chromosome instability caused by Bub1 insufficiency drives tumorigenesis through tumor suppressor gene loss of heterozygosity. *Cancer Cell.* 2009; 16:475–86.
116. Williams BR, Prabhu VR, Hunter KE, Glazier CM, Whittaker CA, et al. Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. *Science.* 2008; 322:703–9.
117. Li M, Fang X, Baker DJ, Guo L, Gao X, et al. The ATM-p53 pathway suppresses aneuploidy- induced tumorigenesis. *PNAS.* 2010; 107:14188–93.
118. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12:385–92.
119. Lentini L, Barra V, Schillaci T, Di Leonardo A. MAD2 depletion triggers premature cellular senescence in human primary fibroblasts by activating a p53 pathway preventing aneuploid cells propagation. *J Cell Physiol.* 2012; 227:3324–32.
120. Duijf PH, Schultz N, Benezra R. Cancer cells preferentially lose small chromosomes. *Int J Cancer.* 2013; 132:2316–26.

121. Baker DJ, Jeganathan KB, Cameron JD, Thompson M, Juneja S, et al. BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat Genet.* 2004; 36:744–49.
122. Baker DJ, Jeganathan KB, Malureanu L, Perez-Terzic C, Terzic A, van Deursen JM. Early aging- associated phenotypes in Bub3/Rae1 haploinsufficient mice. *J Cell Biol.* 2006; 172:529–40.
123. Baker DJ, Dawlaty MM, Wijshake T, Jeganathan KB, Malureanu L, et al. Increased expression of BubR1 protects against aneuploidy and cancer and extends healthy lifespan. *Nat Cell Biol.* 2013; 15:96–102.
124. Hanks S, Coleman K, Reid S, Plaja A, Firth H, et al. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat Genet.* 2004; 36:1159–61.

