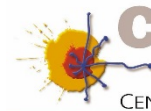




CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



CIC
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
DEL CÁNCER

Universidad de Salamanca

Departamento de Microbiología y Genética

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN Y REGULACIÓN DE LA PROTEÍNA Cdc14A EN EL CICLO DE DIVISIÓN CELULAR

Tesis Doctoral

Sara Ovejero Merino

Salamanca, 2014



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
DEL CÁNCER

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

y

D. Andrés Avelino Bueno Núñez, Catedrático del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada **“Estudio de la función y regulación de la proteína Cdc14A en el ciclo de división celular”** presentada por la Licenciada en Biología y Bioquímica **SARA OVEJERO MERINO**, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, USAL/CSIC, y que reúne a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste a efectos legales, expiden el presente certificado en Salamanca a 25 de Julio de 2014.

Fdo. María de la Paz Sacristán Martín

Fdo. Andrés Avelino Bueno Núñez

A mi abuela...
... y a mis padres.

Tabla de contenidos

ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	17
EL CICLO CELULAR	19
REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR	21
1. Proteínas CDK.....	21
1.1 Reguladores positivos de CDKs	22
1.2 Reguladores negativos: CKI	23
2. MITOSIS	24
3. REGULACIÓN DE LA ENTRADA EN MITOSIS POR LOS COMPLEJOS CDK MITÓTICOS	25
3.1 REGULACIÓN DE LOS COMPLEJOS CDK MITÓTICOS EN LA TRANSICIÓN G2/M.....	25
3.1.1 Fosforilación activadora	26
3.1.2 Fosforilaciones inhibitoras.....	26
3.1.2.1 Fosfatasas activadoras: Cdc25	27
3.1.2.2 Quinasas inhibitoras: Wee1 y Myt1	29
3.1.2.2.1 Funciones de Wee1	29
3.1.2.2.2 Mecanismos de regulación de Wee1	30
3.2 REGULACIÓN DE LA ENTRADA EN MITOSIS POR OTRAS QUINASAS	34
3.2.1 Familia de quinasas Polo	34
3.2.2 Familia de quinasas Aurora	35
3.2.3 Familia NIMA/Proteínas Nek.....	36
3.2.4 Chk1.....	37
3.2.5 Greatwall	37
4. SALIDA DE MITOSIS	39
4.1 DEGRADACIÓN MEDIADA POR EL COMPLEJO APC/C.....	39
4.2 INACTIVACIÓN DE LOS COMPLEJOS CDK.....	40
4.3 DESFOSFORILACIÓN A LA SALIDA DE MITOSIS	40
FOSFATASAS IMPLICADAS EN LA SALIDA DE MITOSIS	41
PP2A	41
PP1.....	42
Fcp1	43
5. FOSFATASAS Cdc14	44
5.1 ScCdc14 en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45

5.2 Flp1/Clp1 en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	46
5.3 Fosfatasa Cdc14 en mamíferos.....	47
5.3.1 Fosfatasa Cdc14 murinas	47
5.3.2 Fosfatasa Cdc14 humanas	48
5.3.2.1 Cdc14A humana	50
Funciones de Cdc14A	50
Regulación de Cdc14A.....	52
5.3.2.2 Cdc14B humana	53
Funciones de Cdc14B	53
Regulación de Cdc14B.....	54
OBJETIVOS	57
RESULTADOS	61
REGULACIÓN DE LA ENTRADA EN MITOSIS POR Cdc14A A TRAVÉS DE Wee1	64
La depleción de Cdc14A produce una disminución de los niveles de Wee1	64
La depleción de Cdc14A acelera la degradación de Wee1 en la transición G2/M	69
La sobreexpresión de Cdc14A produce la desfosforilación de Wee1.....	70
Cdc14A interacciona con Wee1 a través de su dominio amino.....	76
Regulación de Wee1 por Cdc14A.....	79
Cdc14A desfosforila a Wee1 en Ser ¹²³ y Ser ¹³⁹	81
Caracterización de la fosforilación de Wee1 en Ser ¹³⁹	85
Cdc14A regula la estabilidad de Wee1 a través de la desfosforilación de Ser ¹²³ y Ser ¹³⁹ ...	93
La fosforilación en Ser ¹²³ y Ser ¹³⁹ regula la interacción de Wee1 con Plk1.....	93
Cdc14A no desfosforila a Wee1 durante la salida de mitosis	94
REGULACIÓN DE Cdc14A EN CÉLULAS HUMANAS	97
Cdc14A se encuentra fosforilada en células humanas.....	97
Cdc14A es fosforilada en mitosis por los complejos CDK	99
Los complejos CDK fosforilan a Cdc14A en Ser ⁴¹¹ , Ser ⁴⁵³ y Ser ⁵⁴⁹	104
Caracterización funcional de la fosforilación de Cdc14A por los complejos CDK	111
DISCUSIÓN	121
1. REGULACIÓN DE LA TRANSICIÓN G2/M POR Cdc14A A TRAVÉS DE Wee1 EN CÉLULAS HUMANAS	123
Identificación de Wee1 como sustrato de Cdc14A	123
2. POSIBLE REGULACIÓN DE Wee1 POR Cdc14B.....	127
3. REGULACIÓN DE LA ENTRADA EN MITOSIS: POSIBLE RELACIÓN ENTRE Cdc14A Y LA RUTA DE Gwl	128

4. CONTROVERSIA SOBRE LAS FUNCIONES DE LAS FOSFASTASAS Cdc14.....	130
5. REGULACIÓN DE Cdc14A POR FOSFORILACIÓN EN CÉLULAS HUMANAS	131
CONCLUSIONES	139
MATERIALES Y MÉTODOS	143
1. CULTIVO Y TRANSFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES HUMANAS.....	145
1.1 Líneas celulares empleadas.....	145
1.2 Medios y condiciones de cultivo	145
Condiciones de cultivo e inducción de los clones estables U2OS Myc-Cdc14A wt y U2OS Myc-Cdc14A(PD)	146
1.3 Congelación y descongelación de las células	146
1.4 Sincronización de las células	147
1.4.1 Sincronización de las células en G1/S por doble tratamiento con timidina	147
1.4.2 Sincronización de las células en mitosis por tratamiento con nocodazol.....	147
1.5 Tratamiento de las células con otros reactivos.....	148
Tratamiento con MG132	148
Tratamiento con Cicloheximida (CHX)	148
Tratamiento con Ácido Okadaico (OA).....	148
Tratamiento con inhibidores de CDKs.....	148
1.6 Transfecciones transitorias con ADN o ARN	149
1.6.1 Transfección con ADN	149
1.6.2 Transfección con siRNAs	149
1.7 Infección con virus.....	150
1.7.1 Generación de líneas estables mediante infección con retrovirus	150
1.7.2 Infección con adenovirus para deplecionar Cdc14B en células HCT116 Cdc14B ^{flox/flox}	151
2. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	151
2.1 Construcción de plásmidos de ADN recombinante	151
2.1.1 Aislamiento de ADN plasmídico a partir de células de <i>E. coli</i>	152
2.1.2 Determinación de la concentración de ácidos nucleicos	152
2.1.3 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.....	152
2.1.4 Electroforesis de fragmentos de ADN	153
2.1.5 Purificación y ligación de fragmentos de ADN	153
2.1.6 Transformación de <i>E. coli</i>	153
2.1.7 Reacciones de amplificación de ADN (PCR)	154
2.1.8 Secuenciación de ADN.....	156

2.2 Análisis de mRNA	156
3. CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS).....	157
Determinación del índice mitótico mediante citometría de flujo.....	157
4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	158
4.1 Obtención de extractos proteicos totales.....	158
4.2 Valoración de la concentración de proteína de los extractos totales.....	158
4.3 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE	159
4.4 Análisis de proteínas mediante <i>western blot</i>	159
4.5 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE con PhosTag™.....	161
4.6 Tinción con azul de Coomassie.....	161
5. GENERACIÓN DEL ANTICUERPO anti-pSer139(Wee1)	162
6. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GST A PARTIR DE <i>E. coli</i>	162
7. INMUNOPRECIPITACIÓN	162
8. ENSAYOS <i>IN VITRO</i> : ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD QUINASA Y/O FOSFATASA	163
8.1 Ensayos de fosforilación de Wee1 por los complejos Cdk1-Ciclina B1	163
8.2 Ensayos de desfosforilación de Wee1 por Cdc14A	163
8.3 Ensayos de actividad de Cdc14A sobre pNPP	164
9. INMUNOCITOQUÍMICA	164
10. ANÁLISIS PROTEÓMICOS.....	165
BIBLIOGRAFÍA	167
AGRADECIMIENTOS.....	185

ABREVIATURAS

A, Ala: Alanina

aa: aminoácido

AdCre: adenovirus que contienen la Cre recombinasa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

APC/C: Anaphase Promoting Complex/Ciclosome, complejo promotor de anafase/ciclosoma

ARN: Ácido Ribonnucleico

Arpp19: Adenosine monophosphate-regulated phosphoprotein 19, fosfoproteína regulada por adenosina monofosfato 19

ATP: Adenosín Trifosfato

BSA: Bovine Serum Albumin, albúmina de suero bovino

C, Cys: Cisteína

cADN: ADN complementario

CAK: Cdk Activating Kinase, quinasa activadora de Cdk

CAPS: ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico

CD: dominio carboxilo

Cdc: *Cell division cycle*, ciclo de división celular

CDK: *Cyclin Dependent Kinases*, quinasas dependientes de Ciclina

CHX: cicloheximida, inhibidor de la síntesis de proteínas

Cip/Kip: CDK Interactin Protein/Kinase Inhibitor Protein, proteína de interacción con CDK/proteína inhibidora de quinasa

CKI: *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor*, inhibidor de CDKs

CLS: *Cytoplasmic Localizationn Signal*, señal de localización citoplasmática

CPC: *Chromosomal Passenger Complex*

CRS: *Cytoplasmic Retention Signal*, señal de retención citoplasmática

CTD: dominio carboxilo terminal

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTPs: desoxinucleósidos trifosfato

DTT: 1,4-ditiotreitol

E, Glu: ácido glutámico

EDTA: etilen-diamino-tetraacetato

EGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente modificada para emitir más fluorescencia

Ensa: α -Endosulfina

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

FBS: *Foetal Bovine Serum*, suero bovino fetal

FEAR: *Fourteen Early Anaphase Release*, ruta de liberación de ScCdc14 en anafase temprana en *S. cerevisiae*

FL: *Full Length*, proteína que contiene la secuencia completa de aminoácidos

Abreviaturas

Flp1/Clp1: *Fourteen-like phosphatase 1/Cdc-Fourteen-like protein 1*, fosfatasa homóloga de Cdc14 en *S. pombe*

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

Gwl: quinasa Greatwall

H, Hys: Histidina

HEK: *Human Embryonic Kidney*, células de riñón embrionario humano

INK4: *Inhibitor of Cdk4*, inhibidor de Cdk4

Int/Interph.: interfase

IP: inmunoprecipitados

K, Lys: Lisina

Kb: kilobase

KD: *Kinase Dead*, mutante sin actividad quinasa

kDa: kilodalton

KIBRA: *kidney- and brain-expressed protein*, proteína expresada en riñón y cerebro

KO: *Knock Out*, que carecen del gen

LC-MS/MS: *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*, cromatografía líquida espectrometría de masas/espectrometría de masas

λPP: fosfatasa lambda

M: mitosis

M: molar

mA: miliamperio

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

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

mARN: *messenger Ribonucleic Acid*, ARN mensajero

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

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

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

μg: microgramo

mg: miligramo

μl: microlitro

ml: mililitro

μM: micromolar

mM: milimolar

MPF: *Maturation Promoting Factor*, factor promotor de la maduración o de Mitosis

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

ND: dominio amino

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

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

ng: nanogramo
NIMA: *Never In Mitosis A*, nunca en mitosis A, familia de quinasas
NLS: *Nuclear Localization Signal*, señal de localización nuclear
nm: nanómetro
NoLS: *Nucleolar Localization Sequence* o secuencia de localización nucleolar
NZ: nocodazol
OA: ácido okadaico
ORF: *Open Reading Frame*, marco de lectura abierta de un gen
³²P: fósforo 32
P, Pro: Prolina
PBS: tampón fosfato salino
PCR: *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa
PD: *Phosphatase Dead*, mutante sin actividad fosfatasa
pH: $\log_{10}[\text{H}^+]$
pHH3: Histona H3 fosforilada en Ser¹⁰
Plk1: *Polo like kinase 1*, quinasa que participa en la entrada y progresión por mitosis
PMSF: fluoruro de fenil-sulfonil
pNPP: *p-Nitrophenyl Phosphate*, sustrato general de fosfatasa
PP: *Protein Phosphatase*, proteína fosfatasa
Prc1: *Protein regulator of cytokinesis 1*, proteína reguladora de citoquinesis 1
PTP: *Protein Tyrosine Phosphatases*, proteínas tirosina fosfatasa o el dominio catalítico común a esta familia de fosfatasa
Purv: Purvalanol A, inhibidor químico de Cdk1.
R, Arg: Arginina
r.p.m.: revoluciones por minuto
rADN: ADN ribosomal
RINGO/Speedy: *Rapid Inducer of G2/M progression in Oocytes*, inductor rápido de la progresión G2/M en oocitos
RO: RO-3306, inhibidor químico de Cdk1 y Cdk2.
RPE: *Retinal Pigment Epithelium*, células de epitelio pigmentario de retina humana
RT-PCR: *Real Time-Polymerase Chain Reaction*, PCR en tiempo real
S, Ser: Serina
S: fase S, fase de síntesis
SAC: *Spindle Assembly Checkpoint*, punto de control de ensamblaje del huso mitótico
SCF: *SKP1/Cul1/E-box*
SCF^{Tome-1}: *SCF Trigger of mitotic entry*, complejo ubiquitín ligasa
SCF^{βTRCP}: *SCF-box β-Transducin repeat-Containing Protein*, complejo ubiquitín ligasa
SDS: dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE: *SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*, gel de electroforesis de SDS poliacrilamida

Abreviaturas

shRNA: *short hairpin Ribonucleic Acid*, ARN de horquillas cortas

SIMAC: *Sequential Elution from IMAC*, elución secuencial de péptidos unidos a iones metálicos

SIN: *Septation Initiation Network*, ruta de inicio de la septación o citoquinesis en *S. pombe*

siRNA: *small interfering Ribonucleic Acid*, ARN pequeño de interferencia

SPB: *Spindle Pole Body*, cuerpo polar del huso, análogo del centrosoma en células humanas

T, Tet: tetraciclina

Thr, T: Treonina

TAE: Tris Acetato-EDTA

Thy, Thym: timidina

Tris: hidroximetil aminometano

V: Voltio

wt: *wild type*, tipo silvestre

Y, Tyr: Tirosina

INTRODUCCIÓN

EL CICLO CELULAR

El término célula proviene del latín *cellula* y éste a su vez es el diminutivo de *cella*, “hueco”. Fue utilizado por primera vez en 1665 por Robert Hooke en su libro “*Micrographia*” para referirse a los huecos presentes en una laminilla de corcho que aparecían como elementos de repetición formando el tejido vegetal. Posteriormente, la Teoría Celular postulada en 1838 y 1839 por Matthias Jakob Schleiden y Theodor Schwann, proponía que todos los organismos están compuestos por células y que la célula es la unidad básica morfológica y funcional de la vida. Dentro de esta Teoría Celular es especialmente importante el concepto de división celular, expresado inicialmente como “*Omnis cellula ex cellula*” (“Toda célula proviene de otra célula”) por Rudolf Virchow a mediados del s. XIX. Este proceso esencial y altamente complejo da lugar a nuevos organismos unicelulares y constituye organismos pluricelulares, permitiendo su crecimiento y el reemplazo de las células perdidas por senescencia o daño.

El ciclo celular es el conjunto de procesos que permiten que una célula dé lugar a dos células hijas con idéntica información genética. A lo largo de este ciclo, el crecimiento celular, la replicación del material genético y la división celular deben estar perfectamente coordinados. El ADN debe replicarse de forma exacta y única en cada ciclo, condensarse para formar los cromosomas y las cromátidas hermanas deben separarse para que cada una de las células hijas reciba una copia completa de la información genética. En eucariotas, este ciclo está formado por cuatro fases (G1, S, G2 y M), que pueden agruparse en dos: interfase y mitosis.

La **interfase** o período de no división está formada por tres fases: G1, fase S y G2. **G1** (*Gap*, intervalo) es la primera fase. En ella se produce crecimiento celular, síntesis de proteínas y de ARN. Es seguida por la **fase S** (*Synthesis*, síntesis), durante la cual se produce la síntesis o replicación del ADN, que dará lugar a dos copias idénticas del mismo. Posteriormente la célula entra en **G2**, período durante el cual continúa su crecimiento y comprueba que los procesos ocurridos en la fase anterior se han llevado a cabo correctamente. La fase G2 termina cuando el ADN comienza a condensarse y da

Introducción

paso a la **fase M** (de Mitosis). La fase M a su vez se divide en dos procesos: mitosis o división nuclear, y citocinesis o división celular (Figura I-1).

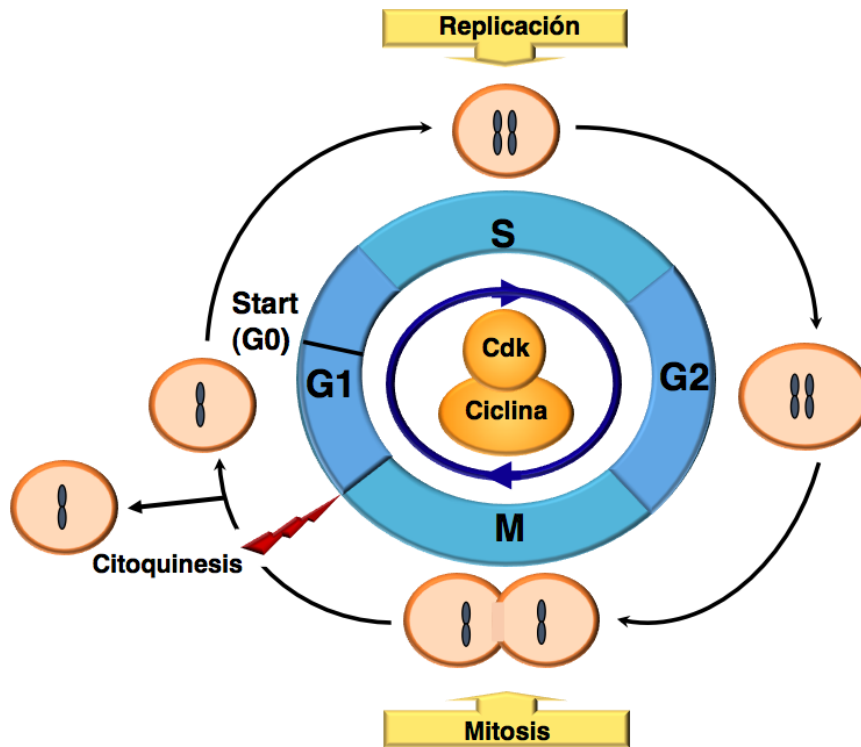


Figura I-1. El ciclo celular. El ciclo celular está formado por las fases G1, S (replicación del ADN), G2 y mitosis (división nuclear y citocinesis). En la figura se muestra el punto de restricción o *Start* en el que las células pueden entrar en estado de quiescencia (G0). En el centro se representa la actividad de los complejos CDK-Ciclina, que promueve la transición de una fase a otra.

REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

1. Proteínas CDK

En las células eucariotas, la progresión por el ciclo celular está controlada principalmente por los complejos formados por las Ciclinas y las CDKs (*Cyclin Dependent Kinases*, quinasas dependientes de ciclina), capaces de fosforilar un gran número de proteínas en residuos Serina o Treonina.

La familia de CDKs está muy conservada evolutivamente. En levaduras una única CDK, denominada Cdc28 en *Saccharomyces cerevisiae* (Reed et al., 1982; Reed et al., 1985) o Cdc2 en *Schizosaccharomyces pombe* (Simanis and Nurse, 1986), es suficiente y necesaria para regular la progresión por las distintas fases del ciclo. En mamíferos existen al menos veinte miembros de la familia CDK, cuatro de las cuales están implicadas en el control del ciclo celular. Cdk4 y Cdk6 regulan la progresión por G1, Cdk2 la entrada y progresión por fase S, y Cdk1 la entrada y progresión por las primeras fases de mitosis, siendo esta última la única CDK esencial en mamíferos (Lees, 1995; Morgan, 1995; Santamaria et al., 2007). Estudios en ratón muestran que Cdk1 es esencial para la división celular en el embrión y es suficiente en todos los tipos celulares al menos hasta la mitad de la gestación (Malumbres and Barbacid, 2009), mientras que Cdk2, Cdk4 y Cdk6 sólo son necesarias para la proliferación de tipos celulares específicos (Barriere et al., 2007; Berthet et al., 2006; Malumbres et al., 2004).

Los niveles de CDKs se mantienen constantes a lo largo del ciclo, mientras que su actividad varía dependiendo de su asociación con distintas Ciclinas, de procesos de fosforilación y desfosforilación, y de la presencia de las proteínas inhibidoras CKI (*Cyclin-dependent Kinase Inhibitor*, inhibidor de CDKs). La regulación de las CDKs es crítica para la supervivencia celular y se ha demostrado que errores en este control son el origen de numerosas enfermedades, entre las cuales destaca el cáncer. Los defectos en el ciclo celular que conducen a la formación de tumores (proliferación no programada, inestabilidad genómica e inestabilidad cromosómica) están mediados, directa o indirectamente, por la desregulación de estas quinasas (Malumbres and Barbacid, 2009).

1.1 Reguladores positivos de CDKs

Las Ciclinas fueron descubiertas en la década de los 80 al estudiar el ciclo celular del erizo de mar (Evans et al., 1983). En general, son proteínas específicas de una o varias fases del ciclo y constituyen la subunidad reguladora de los complejos CDK-Ciclina. Existen Ciclinas en todos los organismos eucariotas estudiados, aunque la única región conservada es la correspondiente a la interacción con CDKs (Kobayashi et al., 1992; Lees and Harlow, 1993). En mamíferos se han identificado varias Ciclinas que regulan la progresión por las fases del ciclo celular y se agrupan en cuatro familias dependiendo de en qué momento actúen (Figura I-2):

- Ciclinas D (D1, D2 y D3): se asocian a Cdk4 y Cdk6. Aparecen en G1 y promueven la entrada en un nuevo ciclo celular.
- Ciclinas E (E1 y E2): se asocian a Cdk2. Aparecen en G1/S y son necesarias para el inicio de la replicación del ADN.
- Ciclinas A (A1 en células germinales y A2 en las no germinales): se asocian a Cdk2 y Cdk1. Permiten la progresión por fase S y la entrada en mitosis.
- Ciclinas B (B1, B2 y B3): se asocian a Cdk1. Son indispensables para la entrada en mitosis. Su destrucción durante metafase y anafase es un evento clave para que se produzcan la salida de mitosis y la citoquinesis.

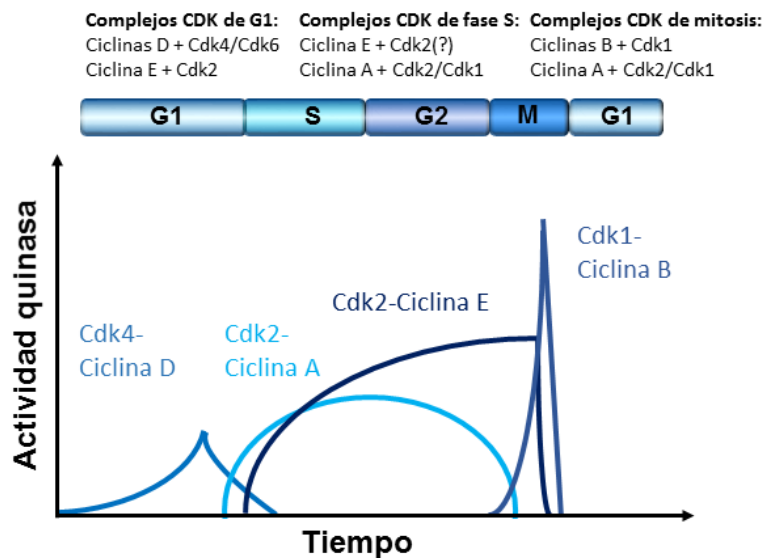


Figura I-2. Actividad de los complejos CDK durante el ciclo celular. En el esquema se muestran las oscilaciones de la actividad de los distintos complejos CDK a lo largo del ciclo. Los complejos CDK de G1 permiten superar el punto de *Start* o inicio del ciclo, los de fase S llevar a cabo la replicación del ADN y los de mitosis la entrada y progresión por esta fase. Posteriormente su actividad cae abruptamente para permitir la salida de mitosis y el inicio de un nuevo ciclo. El símbolo (?) indica una posible intervención indirecta del complejo CDK-Ciclina en la regulación de esa fase.

Las CDKs también pueden ser activadas por proteínas no Ciclina, como RINGO/Speedy (*Rapid Inducer of G₂/M progression in Oocytes*, inductor rápido de la progresión G₂/M en oocitos), presentes en todos los vertebrados estudiados (Chauhan et al., 2012). En mamíferos se unen y activan a Cdk1 y Cdk2, y están implicadas en el control del ciclo celular (Cheng et al., 2005a; Cheng and Solomon, 2008; Cheng et al., 2005b; Dinarina et al., 2009; Karaïskou et al., 2001; Nebreda, 2006).

1.2 Reguladores negativos: CKI

En mamíferos, la actividad de los complejos CDK también está regulada por dos familias de inhibidores:

- **Familia INK4** (*Inhibitor of Cdk4*, inhibidor de Cdk4,): formada por p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}. Se unen a Cdk4 y Cdk6 interfiriendo en su asociación con las Ciclinas D (Sherr and Roberts, 1999).

- **Familia Cip/Kip** (*CDK Interactin Protein/Kinase Inhibitor Protein*, proteína de interacción con CDK/proteína inhibidora de quinasa): formada por p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}. Inhiben a los complejos CDK para frenar la proliferación durante el desarrollo, la diferenciación y la respuesta a estreses celulares (Besson et al., 2008; Harper, 1997; Malumbres and Barbacid, 2005; Pavletich, 1999; Sherr and Roberts, 1999).

Además de regularse positiva y negativamente por estas proteínas, los complejos CDK también sufren una importante regulación por eventos de fosforilación y desfosforilación que detallaremos más adelante.

2. MITOSIS

La mitosis o división nuclear consta de varias fases: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase; aunque estudios más recientes incorporan una fase previa denominada antefase para reflejar de forma más precisa los procesos moleculares que regulan la transición entre G2 y mitosis (Pines and Rieder, 2001).

Se considera antefase al período comprendido entre el final de G2 y el final de profase, en el que la Histona H3 es fosforilada en la Ser¹⁰ para que se condensen los cromosomas. La antefase se caracteriza por ser reversible, ya que se da antes de que los complejos Cdk1-Ciclina B1 sean completamente activos, lo que marcaría el “punto de no retorno” de la entrada en mitosis (Pines and Rieder, 2001). En profase se condensa la cromatina formando los cromosomas y se rompe la envuelta nuclear. En prometafase los microtúbulos que forman el huso mitótico interaccionan desde ambos polos con los cinetocoros de cromátidas hermanas hasta conseguir uniones bipolares estables que dan lugar a la metafase. En esta fase los cromosomas se localizan en el plano ecuatorial de la célula o placa metafásica, donde se mantienen en tensión, hasta que comienza la segregación de los cromosomas o anafase. En ella, las cromátidas hermanas se separan para migrar cada una a un polo opuesto de la célula (anafase A) gracias a las fuerzas de tracción ejercidas por los microtúbulos anclados a los polos opuestos del huso mitótico, y éste se elonga (anafase B). Por último, en telofase las cromátidas se descondensan, se reorganiza la membrana nuclear y se desorganiza el huso mitótico. Posteriormente se produce la citoquinesis, que es la división física de las dos células hijas a partir del anillo contráctil. La progresión por cada una de estas fases requiere de procesos ordenados de fosforilación, desfosforilación y degradación de proteínas.

3. REGULACIÓN DE LA ENTRADA EN MITOSIS POR LOS COMPLEJOS CDK MITÓTICOS

La entrada en mitosis es un momento crítico del ciclo celular, ya que si se inicia antes de que la célula esté preparada para dividirse, puede tener consecuencias fatales para su supervivencia. Por ello existen mecanismos que aseguran que todos los eventos que tienen lugar durante las fases previas (replicación del ADN y crecimiento celular) han concluido correctamente. Estos procesos se sustentan en un control preciso de numerosas proteínas, entre las que destaca fundamentalmente la activación de los complejos Cdk1-Ciclina B1, estrictamente regulada por varios mecanismos.

Ya desde G2, Ciclina A se asocia a Cdk2 y Cdk1. Estos complejos son necesarios para iniciar la transición G2/M hasta que los complejos Cdk1-Ciclina B1 asumen el control de la progresión por las primeras fases de mitosis (Pines and Rieder, 2001). Asimismo, los complejos Cdk1-Ciclina A2 son necesarios para que se produzca la rotura de la envuelta nuclear o NEBD (*Nuclear Envelope Breakdown*), están implicados en la traslocación de la Ciclina B1 al núcleo y en la activación de los complejos Cdk1-Ciclina B1 a través de Cdc25B y Cdc25C, Wee1, la acumulación de Plk1 y de la propia Ciclina B1 (Fung et al., 2007; Gong et al., 2007; Lindqvist et al., 2009; Lukas et al., 1999; Mitra and Enders, 2004; Mitra et al., 2006).

3.1 REGULACIÓN DE LOS COMPLEJOS CDK MITÓTICOS EN LA TRANSICIÓN G2/M

Por un lado, los complejos Cdk1-Ciclina B1 se regulan mediante cambios en su localización subcelular. La Ciclina B1 es citoplasmática durante fase S y G2 (Hagting et al., 1998; Pines and Hunter, 1994; Toyoshima et al., 1998; Yang et al., 1998). En G2, la concentración de Ciclina B1 aumenta en centrosomas, donde comienza la activación de los complejos CDK. Al inicio de mitosis, cuando su actividad se hace máxima, se trasloca al núcleo gracias a eventos de fosforilación, (Gavet and Pines, 2010; Jackman et al., 2003). Por otro lado, la regulación de los complejos CDK mitóticos se basa en un preciso balance de fosforilaciones y desfosforilaciones, que tienen funciones tanto activadoras como inhibidoras.

3.1.1 Fosforilación activadora

Para que se activen los complejos Cdk1-Ciclina B1, es necesario que Cdk1 sea fosforilada en su *T-loop* en una Treonina altamente conservada (Thr¹⁶¹) por la quinasa CAK (Cdk Activating Kinase, quinasa activadora de Cdk), que a su vez es un complejo CDK formado por Cdk7-Ciclina H y Mat1 (Lolli and Johnson, 2005; Solomon et al., 1992). La unión de Cdk1 a Ciclina B1 es proporcional a su fosforilación en Thr¹⁶¹, siendo esta fosforilación un requisito para que se formen complejos estables (Larochelle et al., 2007).

3.1.2 Fosforilaciones inhibitoras

A pesar de que los complejos Cdk1-Ciclina B1 se acumulan durante fase S, permanecen en un estado inactivo hasta el inicio de mitosis debido a fosforilaciones en Thr¹⁴ y Tyr¹⁵. La fosforilación en estos residuos depende de las quinasas Myt1, capaz de fosforilar ambos aunque con preferencia por la Thr¹⁴, y Wee1, que fosforila la Tyr¹⁵ (Liu et al., 1997; Mueller et al., 1995; Parker et al., 1992; Parker and Piwnica-Worms, 1992). La fosforilación de la Thr¹⁴ interfiere en la unión de ATP a Cdk1 (Endicott et al., 1994) y la de la Tyr¹⁵ con la transferencia del fosfato al sustrato (Atherton-Fessler et al., 1993), inhibiendo a los complejos de manera reversible. Estas fosforilaciones son eliminadas por las fosfatasas Cdc25 para permitir la activación de los complejos y la entrada en mitosis. En este mecanismo participan los propios complejos CDK, regulando a sus proteínas activadoras e inhibitoras para promover su propia activación. Este mecanismo de autoamplificación de la actividad de los complejos Cdk1-Ciclina B1 regula la activación de Cdc25C y la estabilización de Cdc25A, al mismo tiempo que inhibe a las quinasas Wee1 y Myt1. Este bucle de retroalimentación positiva permite alcanzar el umbral de actividad CDK necesario para entrar en mitosis. (Figura I-3).

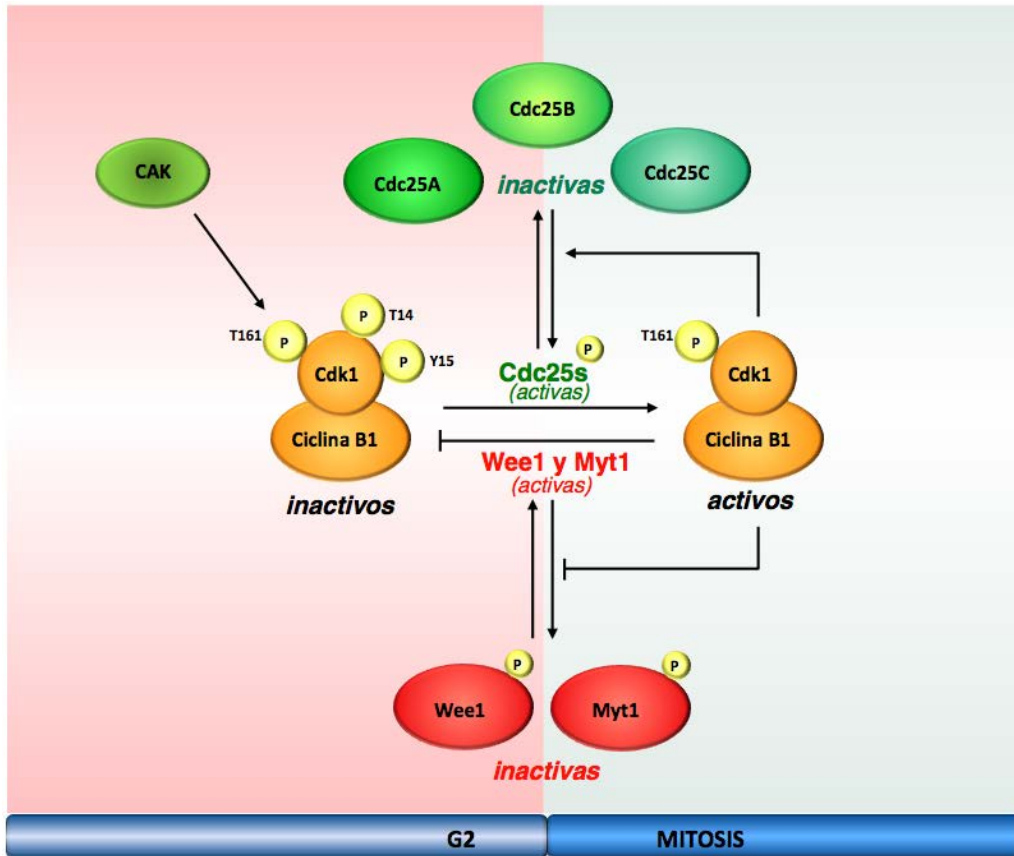


Figura I-3. Mecanismo de activación de los complejos Cdk1-Ciclina B1 en la transición de G2 a mitosis. En el esquema se muestran las fosforilaciones reguladoras de los complejos CDK. Se representan en verde las proteínas activadoras de los complejos y, por tanto, promotoras de la entrada en mitosis, mientras que las proteínas inhibidoras se representan en rojo. Como puede observarse, los complejos CDK amplifican su propia activación mediante la inhibición de Wee1 y Myt1, sus quinasas inhibidoras, al mismo tiempo que fosforilan a las fosfatasas Cdc25 para activarlas y promover su desfosforilación en Thr¹⁴ y Tyr¹⁵.

3.1.2.1 Fosfatasas activadoras: Cdc25

Las Cdc25 son fosfatasas de especificidad dual implicadas en el control de las transiciones G1/S y G2/M regulando la actividad de Cdk1 y Cdk2. Son las responsables de eliminar los grupos fosfato de la Thr¹⁴ y la Tyr¹⁵ de Cdk1 a la entrada en mitosis para permitir su activación (Strausfeld et al., 1991). En mamíferos existen tres Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B y Cdc25C) que poseen una identidad de secuencia cercana al 50% (Nilsson and Hoffmann, 2000). La isoforma Cdc25B inicia la activación de los complejos Cdk1-Ciclina B1 en los centrosomas (De Souza et al., 2000; Jackman et al., 2003; Lammer et al., 1998). Posteriormente, las tres fosfatasas Cdc25 participan en la activación de los complejos Cdk1/2-Ciclina A en el núcleo (Dalal et al., 1999; Gabrielli et al., 1997; Goldstone et al.,

Introducción

2001). También se ha descrito que Cdc25A y Cdc25B, pero no Cdc25C, afectan a la interacción de Cdk1 con Ciclina B1 (Timofeev et al., 2010).

Dado su importante papel en la activación de los complejos CDK mitóticos, las fosfatasas Cdc25 se encuentran estrictamente reguladas por varios mecanismos. Por un lado, sufren cambios en su localización a lo largo del ciclo celular. Cdc25A se encuentra en el núcleo, aunque es traslocada continuamente entre el núcleo y el citoplasma (Hoffmann et al., 1994; Kallstrom et al., 2005). Cdc25B se encuentra en el núcleo, el citoplasma y los centrosomas durante la transición G2/M (Baldin et al., 2003; Boutros et al., 2006; Davezac et al., 2000; Lemaire et al., 2006; Schmitt et al., 2006). Cdc25C se localiza en el citoplasma durante interfase y en el núcleo en mitosis (Donzelli and Draetta, 2003). Los cambios en su localización parecen estar regulados, al menos en parte, por interacción con proteínas 14-3-3.

Por otro lado, sus niveles proteicos también están sujetos a regulación. Cdc25A se sintetiza a partir de G1, se acumula en fase S y G2, y se estabiliza en mitosis como consecuencia de la fosforilación por los complejos Cdk1-Ciclina B1 (Mailand et al., 2002b). Los niveles de Cdc25B son máximos durante la transición G2/M, tras la cual se degrada (Gabrielli et al., 1996; Kieffer et al., 2007; Potapova et al., 2011). Por último, Cdc25C presenta niveles casi constantes a lo largo de un ciclo celular normal, incrementándose ligeramente en fase S (Garner-Hamrick and Fisher, 1998; Turowski et al., 2003). Como respuesta a determinados tipos de *checkpoint*, las fosfatasas Cdc25 son degradadas con el fin de impedir la activación de los complejos CDK y parar la progresión por el ciclo celular (Busino et al., 2003; Donzelli et al., 2002; Eymin et al., 2006; Raj et al., 2001; St Clair et al., 2004; Yan et al., 2007).

La actividad catalítica de las fosfatasas Cdc25 se ve afectada por cambios en su estado de fosforilación, siendo fundamental la acción de los complejos CDK (figura I-3). Además, son sustratos de otras proteínas que las activan para promover la entrada en mitosis (Cazales et al., 2005; Dutertre et al., 2004; Wang et al., 2007) o las inhiben para impedir dicha entrada o parar el ciclo en situaciones de estrés o daño al ADN (Kiyokawa and Ray, 2008; Lemaire et al., 2006; Schmitt et al., 2006).

En cuanto a su regulación durante la transición de G2 a mitosis, cabe destacar el papel que ejerce la fosfatasa Cdc14 sobre las fosfatasa Cdc25, que parece conservado desde *Schizosaccharomyces pombe* hasta vertebrados (Esteban et al., 2004; Krasinska et al., 2007; Vazquez-Novelle et al., 2010; Wolfe and Gould, 2004). En concreto en humanos, estudios previos de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que Cdc14A se une y desfosforila a Cdc25B, inhibiéndola, y también es capaz de inhibir a Cdc25A y promover su degradación (Esteban et al., 2006; Vazquez-Novelle et al., 2010). De esta manera, Cdc14A impide la activación prematura de los complejos Cdk1-Ciclina B1 a través del control de sus fosfatasa activadoras.

3.1.2.2 Quinasas inhibidoras: Wee1 y Myt1

Las quinasas Wee1 y Myt1, activas durante interfase, inhiben a los complejos CDK en diferentes localizaciones subcelulares, Myt1 en la membrana del retículo endoplasmático y el complejo de Golgi, estructuras a las que está asociada (Heald et al., 1993; Liu et al., 1997) y Wee1 en el núcleo (McGowan and Russell, 1993; McGowan and Russell, 1995; Parker et al., 1995; Watanabe et al., 1995). La inactivación de ambas está mediada por los propios complejos Cdk1-Ciclina B1 y otras quinasas, como Plk1, que las fosforilan, produciendo la inhibición de Myt1 y la degradación de Wee1 durante la transición de G2 a mitosis (Booher et al., 1997; Liu et al., 1997; Mueller et al., 1995; Nakajima et al., 2003; Watanabe et al., 2005; Watanabe et al., 2004).

Las funciones y regulación precisa de Wee1 serán detalladas a continuación, ya que son de especial interés para este trabajo de tesis.

3.1.2.2.1 Funciones de Wee1

La quinasa Wee1 es muy importante en la regulación del ciclo celular, como demuestra el hecho de que ratones KO (*knock out*, que carecen del gen) para esta proteína presentan numerosos defectos en el ciclo y muerte celular antes del estadio embrionario E3.5 (Tominaga et al., 2006).

Hasta hace poco, el único papel atribuido a Wee1 era la inhibición de los complejos CDK para evitar una entrada prematura en mitosis, tanto en un ciclo normal como en condiciones de activación de un *checkpoint*. Sin embargo, recientemente se le han

Introducción

atribuido otras funciones en distintos procesos del ciclo celular. Por un lado, se ha descrito que la depleción de Wee1 aumenta el daño al ADN y la inestabilidad genómica. Se ha sugerido que durante fase S Wee1 inactivaría de manera directa a la endonucleasa Mus81-Eme1 (importante en el inicio de la reparación de daño al ADN mediante recombinación homóloga), aunque no se conocen los detalles de esta regulación (Dominguez-Kelly et al., 2011). Por otro lado, Wee1 fosforila la histona H2B en Tyr³⁷ para suprimir la transcripción de histonas durante fase S tardía (Mahajan et al., 2012). El control de la transcripción de histonas es crítico, ya que tanto un exceso como una falta de las mismas tienen efectos deletéreos en las células y conllevan inestabilidad genómica. La fosforilación en Tyr³⁷ por Wee1 en un momento muy concreto de fase S conlleva la separación del activador transcripcional NPAT y el reclutamiento del represor transcripcional HIRA, para permitir la progresión a G2. Posteriormente esta fosforilación es eliminada rápidamente por una fosfatasa aún no identificada (Mahajan et al., 2012).

3.1.2.2.2 Mecanismos de regulación de Wee1

A) Regulación de los niveles de Wee1 mediada por fosforilación

El principal mecanismo de regulación de Wee1 consiste en el control de sus niveles proteicos a lo largo del ciclo celular. Durante fase S y G2, la proteína se acumula, manteniendo inactivos los complejos CDK mitóticos que se están formando en interfase (Watanabe et al., 1995). En la transición G2/M, diversos eventos de fosforilación conllevan la ubiquitinación de Wee1 por las ubiquitín ligasas SCF^{β-TrCP} y SCF^{Tome-1} (*SKP1/Cul1/E-box β-Transducin repeat-Containing Protein* y *Trigger of mitotic entry*, respectivamente) (Ayad et al., 2003; Lim and Surana, 2003; Smith et al., 2007), con su consiguiente degradación por el proteasoma (Watanabe et al., 2004). Esta disminución de los niveles de Wee1 en la célula es clave para asegurar una rápida activación de los complejos Cdk1-Ciclina B1 y la entrada en mitosis.

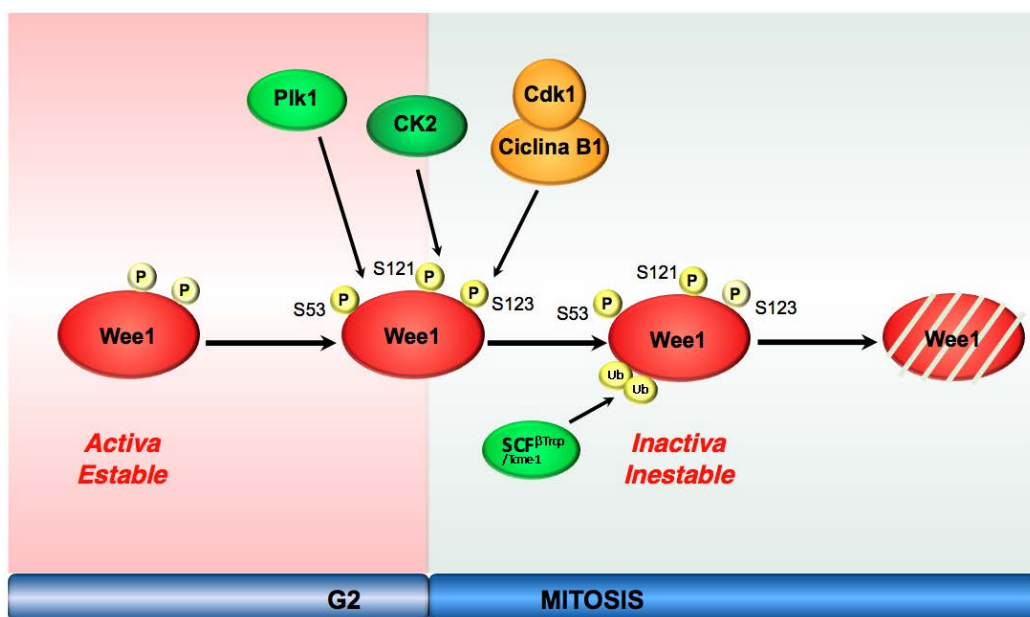
Los mecanismos de degradación basal de la quinasa durante interfase y alta degradación durante mitosis son muy similares. Durante interfase, la Ser¹²³ de Wee1, que forma parte de una secuencia consenso estricta de fosforilación por CDKs (S/T-P-X-K/R), es fosforilada por Cdk2-Ciclina A, lo que conlleva la fosforilación de la Ser¹²¹ por CK2, una quinasa constitutivamente activa a lo largo del ciclo. En conjunto, estas

fosforilaciones promueven la unión de SCF^{β-TrCP} a Wee1 (Yde et al., 2008; Watanabe et al., 2005). En G2/M, la Ser¹²³ es fosforilada por Cdk1-Ciclina B1, induciendo igualmente la fosforilación de Ser¹²¹ por CK2 y, además, la de Ser⁵³ por Plk1. Estas fosforilaciones crean fosfodegrones que inducen una unión fuerte entre Wee1 y β-TrCP y, por tanto, su degradación casi total por el proteasoma (Watanabe et al., 2005; Watanabe et al., 2004) (figura I-4). La subunidad β de CK2 (CK2β) participa en la formación del complejo Plk1-Wee1 uniéndose directamente a Wee1 (Olsen et al., 2010).

Otras regiones de Wee1 también están implicadas en el control de su degradación. Por ejemplo, la Ser⁴⁷², probablemente fosforilada por Cdk2-Ciclina A, contribuye a la degradación basal de la proteína (Owens et al., 2010). Recientemente se ha propuesto que CK1δ también estaría fosforilando a Wee1 para promover su degradación, probablemente en G2/M (Penas et al., 2014).

En conjunto, la hiperfosforilación de Wee1 en la transición G2/M conduce a su degradación, lo que permite la activación máxima y rápida de los complejos Cdk1-Ciclina B1 para promover la progresión por las primeras fases de mitosis.

Éste y los demás mecanismos de regulación de Wee1 se resumen más adelante en la tabla I-1.



I-4. Mecanismo de degradación de Wee1 dependiente de fosforilación durante la transición G2/M. En la figura se muestran únicamente los principales residuos fosforilados para promover la inactivación y degradación de Wee1 durante la entrada en mitosis, así como las quinasas implicadas y el complejo ubiquitín-ligasa encargado de marcarla para degradación.

B) Inactivación por fosforilación

Aunque los niveles de Wee1 en mitosis y G1 son muy similares, su actividad cuando está hiperfosforilada en mitosis es menor que cuando se encuentra desfosforilada en G1, lo que sugiere que la fosforilación podría tener también un papel inhibidor (McGowan and Russell, 1995; Watanabe et al., 1995).

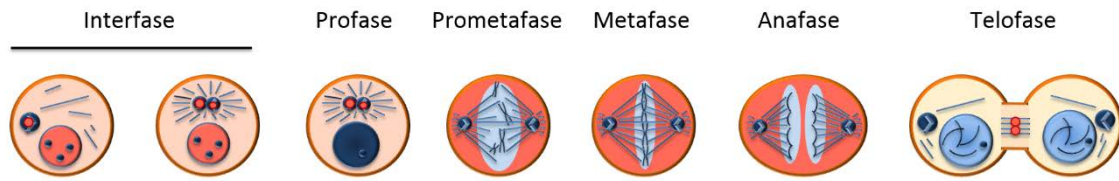
Por otro lado, existe una región denominada “caja Wee1” que está altamente conservada. En *Xenopus* la Thr¹⁸⁶ dentro de esta región es fosforilada por Cdk1 para inhibir a Wee1 (Okamoto and Sagata, 2007). El residuo equivalente en humanos (Thr²³⁹) es fosforilado por los complejos Cdk2-Ciclina A para disminuir la actividad de Wee1 durante fase S y G2 (Li et al., 2010).

C) Activación por autofosforilación

En humanos se ha descrito que Wee1 es capaz de autofosforilarse durante interfase en dos Tirosinas (Tyr²⁹⁵ y Tyr³⁶²), probablemente para promover su propia actividad igual que sucede en *Xenopus*, pero no durante mitosis (Katayama et al., 2005; Kim et al., 2005; Murakami et al., 1999). El mecanismo por el cual estas Tirosinas afectan a la actividad de Wee1 durante el ciclo aún no ha sido estudiado.

D) Cambios en la localización de Wee1 a lo largo del ciclo celular

La quinasa Wee1 es fundamentalmente nuclear, aunque su localización varía durante el ciclo celular. Además de estar presente en el núcleo durante interfase, Wee1 es más abundante en el centrosoma materno que en el duplicado desde fase S hasta G2 temprana-media, y se acumula alrededor de los dos centrosomas en G2 tardía, al igual que Cdk1, Chk1 y Cdc25B. Esto sugiere que existe un balance altamente regulado entre la activación y la inhibición de los complejos CDK en esta localización hasta la entrada en mitosis (Boutros and Ducommun, 2008). Durante mitosis, Wee1 se encuentra distribuida por toda la célula, excepto en la cromatina. En telofase se acumula a lo largo del plano de división y desaparece casi completamente del citoplasma, manteniéndose sólo a nivel del cuerpo medio. Durante la citoquinesis, se localiza en ambas células hijas a los dos lados del huso mitótico en desaparición, al tiempo que empieza a aparecer de nuevo en el núcleo (Baldin and Ducommun, 1995)(figura I-5).



I-5. Localización de Wee1 a lo largo del ciclo celular. En el esquema Wee1 se muestra en rojo, la intensidad del color indica la mayor o menor acumulación en una determinada estructura. Esquema de las células adaptado de Bollen et al., 2009.

Se desconoce con detalle qué mecanismos regulan estos cambios en la localización de Wee1 a lo largo del ciclo celular, aunque hay datos que apuntan a su interacción con proteínas 14-3-3. Se ha descrito que durante la transición S/G2 y hasta el inicio de mitosis, la fosforilación de la Ser⁶⁴² mediada por Akt promueve la unión de Wee1 a 14-3-3 θ y su traslocación al citoplasma, probablemente para permitir la entrada en mitosis (Katayama et al., 2005). Por otra parte, Cdk2-Ciclina A interacciona con Wee1 a través de motivos RLX para promover su exportación fuera del núcleo gracias a Crm1, aunque este proceso no parece esencial para la entrada en mitosis (Li et al., 2010).

RESIDUO	QUINASA	FASE DEL CICLO	FUNCIÓN
Serina ⁵³	Plk1	G2/M	Degradación
Serina ⁴⁸ Aspártico ⁵² Glutámico ⁵⁷ Serina ⁶⁰		G2/M	Reconocimiento por SCF ^{βTrcp/Tome1}
Serina ¹²¹	CK2	G2/M	Interacción con Plk1
Serina ¹²³	Cdk1-Ciclina B1 Cdk2-CiclinaA(?)	G2/M Interfase	Interacción con Plk1
Treonina ²³⁹	Cdk1/Ciclina B1 Cdk2/Ciclina A	Interfase	Inhibición
Tirosina ²⁹⁵ Tirosina ³⁶²	Auto-fosforilación	Interfase	Activación
Serina ⁴⁷²	Cdk2-Ciclina A	Interfase y G2/M	Degradación
Serina ⁶⁴²	Akt, ¿otras?	S/G2 - Mitosis	Interacción 14-3-3, salida al citoplasma

Tabla I-1. Mecanismos de regulación de Wee1. En la tabla se resumen los residuos de Wee1 con un papel descrito en el control de la proteína, la quinasa o quinasas que los fosforilan (en el caso de ser fosfo-residuos), las fases del ciclo en las que son importantes y cuál es la función que desempeñan en la regulación de la proteína.

E) Interacción con proteínas 14-3-3

Las 14-3-3 forman una familia de proteínas reguladoras conservadas en eucariotas. Interaccionan con numerosos sustratos tanto de manera dependiente como independiente de fosfo-Serina y controlan procesos relacionados con el crecimiento y diferenciación celular, supervivencia, apoptosis, migración, etc. (Mhaweck, 2005).

Wee1 presenta varios sitios potenciales de unión con 14-3-3, de los cuales se ha demostrado que la Ser⁶⁴² es importante, ya que media el reconocimiento de varias isoformas de estas proteínas. La unión a ellas es controvertida, puesto que varias quinasas podrían fosforilar este residuo con distintas consecuencias según la 14-3-3 con la que se produjera la interacción. Por ejemplo, durante interfase la interacción con 14-3-3 β estabiliza a Wee1, probablemente mediante la inducción de cambios conformacionales (Wang et al., 2000), y la activa (Rothblum-Oviatt et al., 2001). Durante mitosis, tras la fosforilación por Akt, 14-3-3 θ la secuestraría en el citoplasma, impidiendo que inhiba a los complejos CDK (Katayama et al., 2005).

Todos estos datos sugieren que la fosforilación de la Ser⁶⁴² puede ser tanto estimuladora como inhibidora de la actividad de Wee1, dependiendo de qué 14-3-3 se una y en qué momento del ciclo (Katayama et al., 2005; Lee et al., 2001; Lu et al., 2004; Rothblum-Oviatt et al., 2001; Wang et al., 2000).

3.2 REGULACIÓN DE LA ENTRADA EN MITOSIS POR OTRAS QUINASAS

En la entrada en mitosis participan otras quinasas además de los complejos CDK. Estas quinasas son importantes no sólo por intervenir en los mecanismos de activación de los complejos CDK, sino porque también controlan eventos imprescindibles para permitir la correcta entrada y progresión por las primeras fases de mitosis.

3.2.1 Familia de quinasas Polo

Las *Polo like kinases* o Plks, son quinasas que fosforilan Serinas o Treoninas. En mamíferos existen cinco isoformas (Plk1 a 5). Es frecuente que las Plks fosforilen proteínas previamente fosforiladas por CDKs u otras quinasas, lo que indica la importancia del orden y el balance de las actividades de las quinasas para controlar determinados procesos durante el ciclo celular (Elia et al., 2003). Plk1 y Plk4 presentan

papeles importantes en el control del ciclo celular. Su expresión es alta en tejidos embrionarios, mientras que en adultos se encuentra predominantemente en tejidos en proliferación (de Carcer et al., 2011).

De las quinasas que forman parte de esta familia, Plk1 es la más estudiada y la que tiene un papel más importante en la regulación de la progresión por el ciclo celular. Mediante la fosforilación de distintos sustratos, Plk1 controla la entrada en mitosis, la elongación del huso en anafase, la segregación cromosómica y la citoquinesis (de Carcer et al., 2011; Petronczki et al., 2007; Santamaria et al., 2007). Además, promueve la maduración de los centrosomas necesaria para la nucleación y mantenimiento de los microtúbulos y la formación del huso mitótico (Barr et al., 2004). Para llevar a cabo estas funciones, Plk1 cambia de localización subcelular a lo largo del ciclo (Kishi et al., 2009), y sus niveles y actividad catalítica están estrictamente regulados (Barr et al., 2004; Hamanaka et al., 1994; Holtrich et al., 1994; Lindon and Pines, 2004; Petronczki et al., 2008; Yamashiro et al., 2008).

En cuanto a la transición G2/M, Plk1 tiene un papel fundamental en la degradación de Wee1 durante la entrada en mitosis para permitir la activación de los complejos CDK (Watanabe et al., 2005; Watanabe et al., 2004). Además, fosforila e inactiva a Myt1 (Nakajima et al., 2003) e interacciona con Cdc25C para activarla y promover su traslocación al núcleo (Elia et al., 2003; Roshak et al., 2000; Toyoshima-Morimoto et al., 2002; van Vugt and Medema, 2005). Por otra parte, Ciclina B1 es fosforilada por Plk1 en los centrosomas durante profase, lo que contribuye a la activación de los complejos CDK en esta localización (Jackman et al., 2003; Toyoshima-Morimoto et al., 2001).

3.2.2 Familia de quinasas Aurora

Las quinasas Aurora son muy importantes en el control de numerosos procesos que van desde la entrada en mitosis hasta la citoquinesis. En mamíferos existen tres proteínas de esta familia de quinasas: Aurora A, Aurora B y Aurora C, esta última es muy similar a Aurora B y se expresa únicamente en testículos.

Las quinasas Aurora A y B son muy parecidas a nivel de secuencia y estructura. Se regulan a varios niveles: activación local, control de la expresión, degradación

Introducción

dependiente de APC/C^{Cdh1} (Anaphase Promoting Complex/Ciclosome, complejo promotor de anafase/ciclosoma) y unión a cofactores específicos para su completa activación (Bayliss et al., 2004; Bayliss et al., 2003; Carmena et al., 2009; Fu et al., 2007; Nguyen et al., 2005; Vagnarelli and Earnshaw, 2004). Sus funciones durante mitosis son distintas. Por una parte, Aurora A interviene en la maduración y separación de los centrosomas, y la formación del huso mitótico (Fu et al., 2007; Marumoto et al., 2003; Mori et al., 2007). Por su parte, Aurora B está implicada en el inicio de la condensación cromosómica (Crosio et al., 2002; Giet and Glover, 2001; Hsu et al., 2000; Van Hooser et al., 1998), la unión de los cromosomas al huso, la activación del SAC (Spinde Assembly Checkpoint, *checkpoint* del ensamblaje del huso mitótico) (Morrow et al., 2005; Vigneron et al., 2004) y la citoquinesis (Delaval et al., 2004; Fu et al., 2007; Goto et al., 2003; Kawajiri et al., 2003; Minoshima et al., 2003; Severson et al., 2000).

En cuanto a su participación en la regulación de los complejos CDK, Aurora A fosforila a Cdc25B, lo que promueve su activación y, en consecuencia, la de los complejos Cdk1-Ciclina B1 centrosomales (Cazales et al., 2005; Dutertre et al., 2004; Hirota et al., 2003). También en centrosomas, se une a su cofactor Bora para activar a Plk1, que a su vez contribuye a la activación de los complejos como se describió anteriormente (Macurek et al., 2008; Seki et al., 2008).

3.2.3 Familia NIMA/Proteínas Nek

En mamíferos, la familia NIMA (Never In Mitosis gene A, nunca en mitosis gen A) incluye 11 proteínas denominadas Nek, de las cuales Nek2, Nek6, Nek7 y Nek9 están implicadas en la regulación de mitosis (O'Regan et al., 2007).

La quinasas Nek2 es activa durante fase S y G2, y fosforila proteínas del centrosoma, lo que implica la separación de los centrosomas antes de mitosis en un proceso iniciado por Plk1 (Helps et al., 2000; Mardin et al., 2010; Mi et al., 2007; O'Regan et al., 2007). Posteriormente, Cdk1 fosforila a Nek9 durante mitosis, permitiendo que la subpoblación centrosomal de la proteína interactúe y sea fosforilada por Plk1 para activarse. Esta activación es necesaria para que se produzca el reclutamiento de γ -tubulina y la maduración de los centrosomas (Sdelci et al., 2012). A su vez, Nek9 fosforila a Nek6/Nek7, activándolas para que recluten a la quinesina Eg5 a los centrosomas,

regulen la progresión por mitosis y contribuyan a la formación del huso bipolar (O'Regan and Fry, 2009; Richards et al., 2009; Roig et al., 2002). Esta cascada de fosforilaciones controla la separación de los centrosomas durante profase (Bertran et al., 2011; Sdelci et al., 2012).

3.2.4 Chk1

La quinasa Chk1 es un componente esencial en el establecimiento de diversos tipos de *checkpoint*. Sin embargo, se ha descrito que también tiene un papel en la regulación del ciclo celular en ausencia de daño o estrés. En fase S está implicada en el disparo de orígenes de replicación y la progresión de las horquillas (Petermann et al., 2010). También regula la entrada en mitosis a través de la fosforilación de Cdc25A y Cdc25B. Estas fosforilaciones promueven la interacción de las fosfatasa Cdc25 con proteínas 14-3-3, lo que impediría su unión a los complejos CDK y, por lo tanto, la activación prematura de éstos (Boutros and Ducommun, 2008; Chen et al., 2003; Giles et al., 2003; Lam and Rosen, 2004; Schmitt et al., 2006; Sorensen et al., 2003; Uto et al., 2004; Zhao et al., 2002). En la transición de G2 a mitosis, Chk1 sale de los centrosomas, permitiendo que Cdc25B active a los complejos CDK mitóticos (Kramer et al., 2004; Loffler et al., 2006).

3.2.5 Greatwall

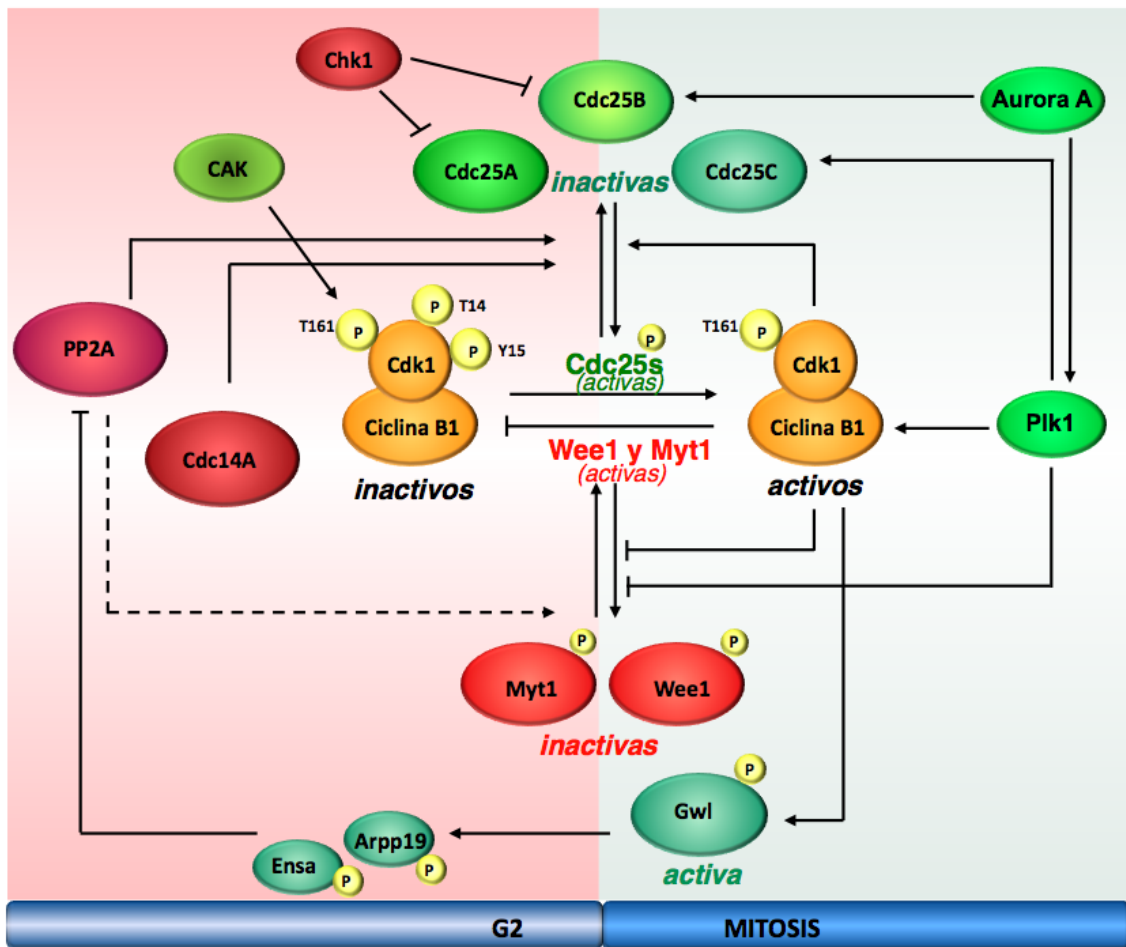
En *Drosophila* se descubrió una nueva quinasa, denominada Greatwall (Gwl), importante para modular la actividad de Polo, la condensación del ADN y el establecimiento de la mitosis (Glover, 2012; White-Cooper et al., 1996; Yu et al., 2004). En humanos, el ortólogo de Gwl se denomina MAST-L (*Microtubule-associated serine/threonine kinase-like protein*, proteína parecida a la serina/treonina quinasa asociada a microtúbulos) (Burgess et al., 2010), aunque de ahora en adelante nos referiremos a ella como Gwl.

Se ha descrito que Gwl es activada por los complejos Cdk1-Ciclina B1 e inhibe a la fosfatasa PP2A, inclinando la balanza a favor de las fosforilaciones que permiten la entrada en mitosis (Vigneron et al., 2009; Voets and Wolthuis, 2010). Al final de G2, la quinasa Gwl fosforila a Ensa (*α -Endosulfine*) y Arpp19 (*Adenosine monophosphate-*

Introducción

regulated phosphoprotein 19, fosfoproteína regulada por adenosina monofosfato 19). Ensa y Arpp19 se unen e inhiben a PP2A-B55 cuando están fosforiladas, promoviendo la entrada en mitosis (Gharbi-Ayachi et al., 2010) (figura I-6).

Recientemente se ha demostrado en ratones KO que Gwl es esencial para el desarrollo embrionario y la progresión por el ciclo celular. Aunque su ausencia no impide la entrada en mitosis, produce colapso mitótico tras la NEBD por activación prematura de PP2A-B55 (Alvarez-Fernandez et al., 2013).



I-6. Quinasas y fosfatasas que regulan la activación de los complejos CDK en la entrada en mitosis. Al igual que en la figura I-3, se muestran en verde las proteínas que promueven la activación de los complejos Cdk1-Ciclina B1, las fosfatasas Cdc25 y la quinasa CAK que los activan directamente, Aurora A, Plk1, y la quinasa Gwl y sus sustratos Arpp19/Ensa que contrarrestan la actividad fosfatasa que se opone a ellos. En rojo se muestran las proteínas inhibitoras de los complejos tanto de manera directa (Wee1 y Myt1) como indirecta (Cdc14A y PP2A).

4. SALIDA DE MITOSIS

Para que se produzca la salida de mitosis y el inicio de un nuevo ciclo celular, es necesario que la actividad de los complejos CDK mitóticos descienda drásticamente y sus sustratos, y los de otras quinasas mitóticas, sean desfosforilados y/o degradados (Potapova et al., 2011; Skoufias et al., 2007). Estos procesos de degradación y desfosforilación se encuentran estrictamente regulados y deben darse en un orden concreto para que la división celular concluya con éxito. Desde el inicio de mitosis y hasta el final de metafase, las cromátidas se mantienen unidas gracias a la acción de las cohesinas (Gerlich et al., 2006). Durante este período, la separasa se mantiene inhibida debido a la fosforilación por CDKs y a la acción de la securina. Posteriormente se activa para degradar a las cohesinas y así permitir la separación de las cromátidas (Nishiyama et al., 2010; Oliveira and Nasmyth, 2010; Sullivan and Morgan, 2007).

4.1 DEGRADACIÓN MEDIADA POR EL COMPLEJO APC/C

APC/C es un complejo con actividad ubiquitín ligasa formado por 15-17 proteínas presente en todos los eucariotas. Este complejo ubiquitina numerosos sustratos y es el responsable de la degradación ordenada de proteínas durante el final de la mitosis. Algunos de estos sustratos son las Ciclinas mitóticas, cuya destrucción es esencial para que se inactiven los complejos CDK; las quinasas mitóticas Polo y Aurora; o la securina (Acquaviva and Pines, 2006; Fung and Poon, 2005; Lindqvist et al., 2009; Pines, 2011; Smits and Medema, 2001; van Leuken et al., 2008). APC/C se mantiene inactivo durante fase S y G2 gracias a Emi1, hasta que ésta es degradada tras sufrir fosforilación por Plk1, permitiendo su activación (Petronczki et al., 2008). La activación de APC/C en un momento muy concreto de la mitosis es crucial para la correcta segregación cromosómica y está mediada en parte por los complejos CDK mitóticos, que fosforilan varias subunidades de APC/C para que se una a su co-activador Cdc20. El SAC mantiene al complejo APC/C^{Cdc20} inactivo hasta metafase, momento en el que su activación conlleva la degradación de securina y Ciclina B1. Posteriormente, APC/C se asocia con Cdh1 y ubiquitina de forma ordenada sustratos específicos, como son Plk1, Aurora A y Aurora B, o la propia Cdc20. Sin embargo, el estudio de ratones KO demuestra que la falta de Cdh1 no es letal, aunque los animales que carecen de ella presentan un aumento

en la inestabilidad cromosómica y problemas en la proliferación celular (Garcia-Higuera et al., 2008).

4.2 INACTIVACIÓN DE LOS COMPLEJOS CDK

Hemos explicado la importancia de la actividad de los complejos CDK para promover la entrada y correcta progresión por las primeras fases de mitosis. Para que las células salgan de mitosis y completen la división celular, es necesario que la actividad de estos complejos sea inhibida.

APC/C^{Cdc20} media la degradación de las Ciclinas mitóticas y con ella la inhibición de los complejos CDK (revisado en (Yu, 2007)). En primer lugar se degrada Ciclina A durante prometafase y posteriormente Ciclina B1 al inicio de anafase. Se ha descrito que niveles elevados de Ciclina A retrasan la transición de metafase a anafase (Geley et al., 2001) y que un mutante no degradable de Ciclina B1 para las células en mitosis (Wolf et al., 2006), lo que indica que la degradación de estas Ciclinas es un paso esencial para la salida de mitosis. En anafase, la separasa que no está unida a securina también puede unirse directamente a Ciclina B1, inhibiendo así a Cdk1 (Gorr et al., 2005). Estos dos mecanismos, degradación de Ciclinas e inhibición por la separasa, permiten que los niveles de actividad CDK disminuyan por debajo de un determinado umbral y se puedan activar los mecanismos que promueven la salida de mitosis.

4.3 DESFOSFORILACIÓN A LA SALIDA DE MITOSIS

Históricamente, se consideraba que las quinasas eran responsables principales de los procesos mitóticos, mientras que las fosfatasas parecían tener un papel secundario. En los últimos años, numerosos trabajos han puesto de manifiesto la importancia de las fosfatasas, así como el papel regulador que tiene el balance entre las actividades quinasa y fosfatasa (revisado en (Trinkle-Mulcahy and Lamond, 2006) y en (Uhlmann et al., 2011)). La desfosforilación de sustratos de CDKs es necesaria, por ejemplo, para procesos específicos como la reorganización y posterior desensamblaje del huso mitótico, la formación de la envuelta nuclear, la descondensación de la cromatina durante telofase o la reorganización del aparato de Golgi (Oliveira and Nasmyth, 2010).

FOSFATASAS IMPLICADAS EN LA SALIDA DE MITOSIS

En *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc14 (Cell division cycle 14) es la fosfatasa de salida de mitosis más importante. Se trata de un gen esencial implicado en numerosos procesos de esta fase del ciclo cuya función y regulación están muy bien caracterizadas. Sin embargo, su función no está conservada en el resto de organismos eucariotas. En mamíferos, varias fosfatasas han sido implicadas en el control de este punto del ciclo, siendo las familias de fosfatasas PP1 y PP2A las que parecen tener un papel más relevante. Sus funciones, sustratos, localización y reguladores durante la salida de mitosis se resumen en la Tabla I-2.

PP2A

PP2A es una serina-treonina fosfatasa conservada en todos los eucariotas. Está formada por un complejo heterotrimérico consistente en una subunidad estructural (A), una subunidad reguladora (B) y una subunidad catalítica (C). Cada una de ellas presenta varias isoformas, que se combinan para formar múltiples complejos con diferentes características y funciones. Concretamente durante la salida de mitosis, PP2A se une a la familia de subunidades reguladoras B55.

En células humanas, PP2A-B55 α participa en la regulación de la salida de mitosis ((Schmitz et al., 2010); revisado en (Wurzenberger and Gerlich, 2011)) y estudios en ratón sugieren que PP2A-B55 δ también estaría contribuyendo en este proceso (Manchado et al., 2010). Después de metafase, PP2A-B55 debe activarse para regular determinados procesos como el desensamblaje del huso mitótico y la descondensación de los cromosomas (Lowe et al., 2000; Schmitz et al., 2010). Además, los datos disponibles indican que PP2A-B55 promueve la inactivación de la ruta de Gwl mediante la defosforilación de Ensa, de manera que existiría un mecanismo de doble regulación negativa cuyo balance se inclinaría a favor de la quinasa durante la entrada en mitosis y de la fosfatasa durante la salida (Cundell et al., 2013; Hegarat et al., 2014). Además, tanto PP2A-B55 α como PP2A-B56 parecen regular a Prc1 (Protein regulator of citokinesis 1, proteína reguladora de citoquinesis 1), un componente importante para la elongación del huso en anafase y la estabilidad y organización de los microtúbulos (Walczak and Shaw, 2010).

PP1

PP1 es una serina-treonina fosfatasa muy conservada en eucariotas formada por una subunidad catalítica (α , β/δ o γ) unida a una subunidad reguladora variable, que conlleva la formación de numerosas holoenzimas con función y regulación específicas (Andreassen et al., 1998; Bollen et al., 2010; Ceulemans and Bollen, 2004; Trinkle-Mulcahy et al., 2006; Trinkle-Mulcahy and Lamond, 2006; Wurzenberger and Gerlich, 2011).

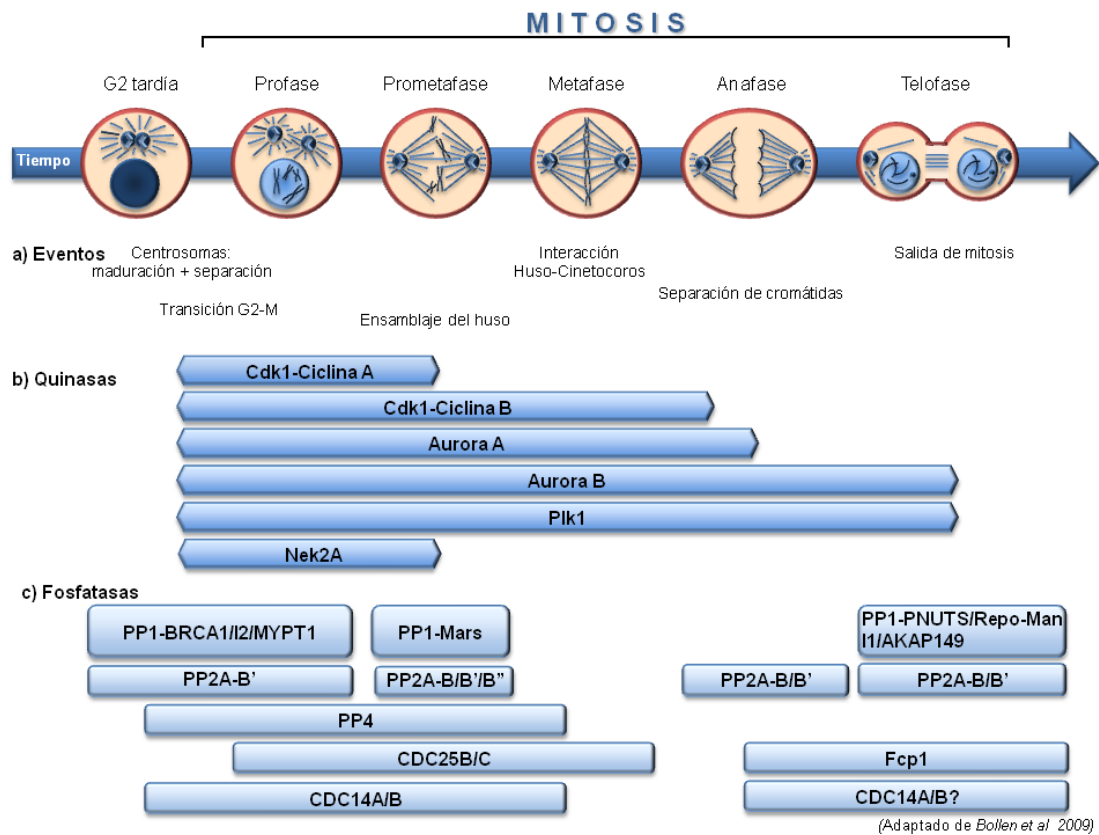
	Localización	Función en salida de mitosis	Sustratos	Reguladores
Fcp1	Zona media del huso y cuerpo medio	Inactivación del MPF (activación de Wee1, degradación de Ciclina B) Silenciamiento del SAC (degradación de Cdc20)	Cdc20 USP44 Wee1 Ensa	(?)
PP1α	Cinetocoros Centrosomas	Reensamblaje de la membrana nuclear	Aurora B Histona H1	I-1, I-2 CDKs CENP-E
PP1β/δ	Cromosomas	(?)	(?)	(?)
PP1γ	Microtúbulos del huso Cinetocoros	Descondensación de la cromatina	Thr ³ (HH3)	I-1, I-2 Repo-Man PNUTS
PP2A-B55α/δ	Citoplasma	Reensamblaje del Golgi y la membrana nuclear	Prc1 Ensa	Arpp19 Ensa

Tabla I-2: Fosfatasas que regulan la salida de mitosis. En la tabla se muestran las fosfatasas con papeles descritos en la regulación de la mitosis, especificando su localización, función, sustratos y proteínas reguladoras conocidas. En el caso de aquéllas con varias isoformas, se muestran los datos específicos para cada una de dichas isoformas. (?) Indica que la fosfatasa no presenta ninguna función durante la salida de mitosis o se desconocen los datos.

Fcp1

Fcp1 fue inicialmente identificada como la fosfatasa del dominio carboxilo terminal de la ARN polimerasa II, participando en el control de la transcripción. Estudios recientes sugieren su participación en la salida de mitosis. Algunos de sus sustratos son Cdc20, USP44 (peptidasa desubiquitinasa que antagoniza la actividad de APC/C), Wee1 (Visconti et al., 2012) y Ensa (Hegarar et al., 2014). Los datos disponibles sugieren que a la salida de mitosis podría ser la primera fosfatasa en contrarrestar la actividad CDK a través de la desfosforilación de Wee1 y de sustratos encargados de mantener el SAC, para que posteriormente otras fosfatasa, como PP1 y PP2A, contribuyan a completar la mitosis y la citoquinesis.

En la figura I-7 se esquematiza la intervención a lo largo de la mitosis de las distintas quinasas y fosfatasa descritas en esta introducción.



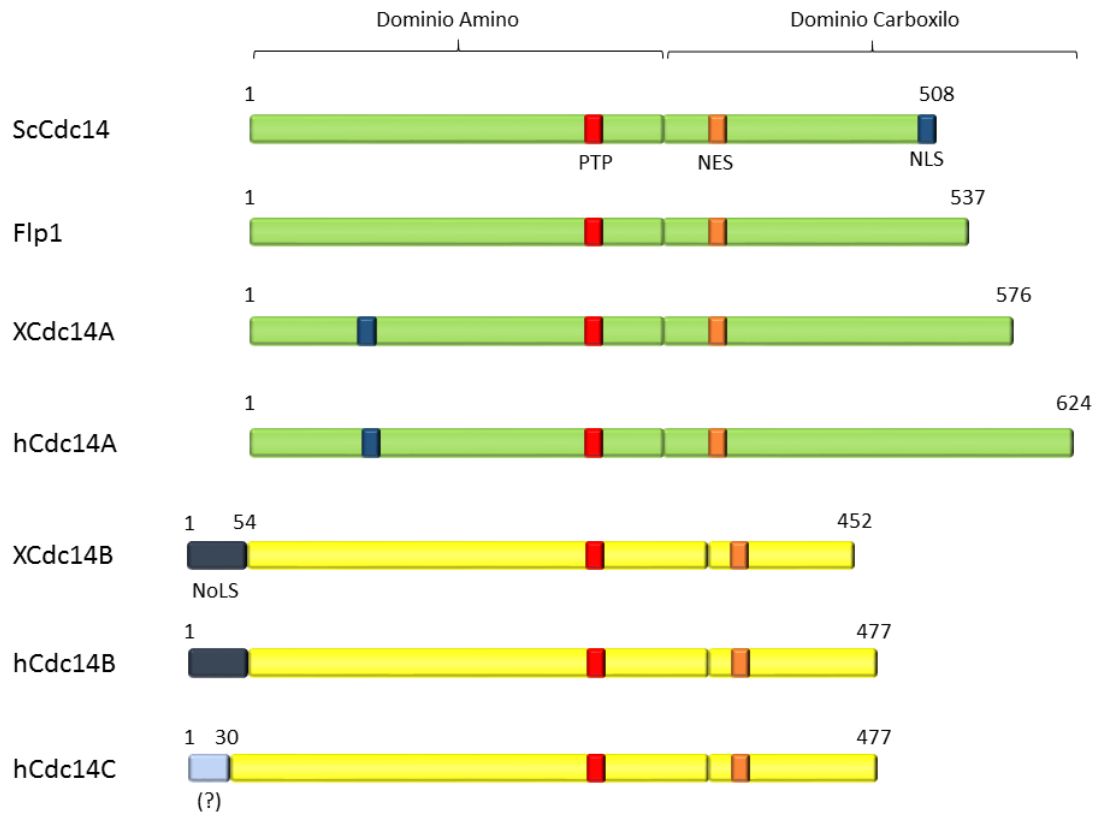
I-7. Quinasas y fosfatasa que regulan la entrada, progresión y salida de mitosis. En la parte superior se muestran las distintas fases de la mitosis así como los principales eventos que tienen lugar en cada una de ellas. En la parte inferior se muestran tanto las quinasas como las fosfatasa con funciones conocidas a lo largo de este proceso. La longitud de las barras y su coincidencia con las fases nombradas en la parte superior indican la extensión de su actividad (adaptado de Bollen et al., 2009).

5. FOSFATASAS Cdc14

Las proteínas Cdc14 forman una familia de fosfatasas que se incluye dentro de la superfamilia de fosfatasas “Proteína-Tirosina” debido a que poseen un dominio catalítico de tipo PTP (*Protein-Tyrosine Phosphatase*, proteína tirosina fosfatasa). Dentro de esta superfamilia, a su vez se consideran dentro del grupo de fosfatasas de especificidad dual. Este grupo presenta capacidad para desfosforilar tanto residuos fosfo-Tirosina como fosfo-Serina y fosfo-Treonina, estas últimas fosforiladas por MAPK o CDK. La secuencia consenso mínima para CDK es $\underline{S}/\underline{T}$ -P y la secuencia consenso estricta o canónica es $\underline{S}/\underline{T}$ -P-X-R/K, siendo X cualquier aminoácido (Ducruet et al., 2005; Gray et al., 2003; Kaiser et al., 2004). En las fosfatasas de especificidad dual, el dominio catalítico está muy conservado y contiene el motivo HC_{X5}R en el cual la Cisteína es crucial para la actividad (Denu and Dixon, 1998; Mocciaro and Schiebel, 2010).

La familia de fosfatasas Cdc14 presenta un dominio catalítico N-terminal de unos 350 aminoácidos altamente conservado y un dominio C-terminal no conservado que contiene una secuencia NES (*Nuclear Exclusion Sequence*, secuencia de exclusión nuclear) que determina el transporte de estas fosfatasas fuera del núcleo en todos los eucariotas en los que se han identificado (figura I-8).

Respecto a su actividad, estudios recientes indican que tienen preferencia por eliminar la fosforilación debida a CDKs en residuos de Serina, en concreto, sus sustratos óptimos poseen un residuo básico en la posición +3 relativa a la fosfo-Serina. Se cree que esta alta selectividad podría ser la responsable de establecer el orden de la desfosforilación de los sustratos de CDKs durante distintos procesos celulares, como la entrada o salida de mitosis, ya que los sustratos que podrían denominarse “más afines” serían desfosforilados antes que los “menos afines” (Bremmer et al., 2012). Los miembros de la familia Cdc14 tienen diversas funciones, principalmente relacionadas con la regulación del ciclo celular, ya que son antagonistas de la actividad CDK, aunque dichas funciones varían según el organismo.



I-8. Estructura primaria y conservación evolutiva de las fosfatasa Cdc14. En la figura se muestran los dominios amino y carboxilo de las fosfatasa Cdc14 en distintas especies, y su tamaño en la parte superior (Sc: *S. cerevisiae*; Flp1: *S. pombe*; X: *Xenopus*; h: *Homo sapiens*). PTP: dominio fosfo-Tirosina fosfatasa. NES: secuencia de exclusión nuclear. NLS: secuencia de localización nuclear. NoLS: secuencia de localización nucleolar. (?) indica que se desconoce si esa secuencia se transcribe (Adaptado de Mocciaro y Schiebel., 2010).

5.1 ScCdc14 en *Saccharomyces cerevisiae*

El primer miembro de la familia Cdc14 fue identificado en la levadura de gemación *S. cerevisiae* (Hartwell et al., 1974). ScCdc14 es una proteína esencial para la salida de mitosis, en la que inhibe a los complejos CDK mitóticos y desfosforila varios de sus sustratos (Bardin and Amon, 2001; Jaspersen et al., 1999; Visintin et al., 1998). El orden de los procesos que tienen lugar en esta fase del ciclo viene determinado por la regulación en varios pasos de la localización y activación de ScCdc14 gracias a las rutas FEAR (*Fourteen Early Anaphase Release*, liberación de ScCdc14 en anafase temprana) y MEN (*Mitosis Exit Network*, ruta de salida de mitosis) (Azzam et al., 2004; Bardin et al., 2000; Faust et al., 2013; Jaspersen et al., 1998; Jensen et al., 2002; Palani et al., 2012; Shou et al., 1999; Stegmeier and Amon, 2004; Stegmeier et al., 2002). ScCdc14 se encuentra localizada en el nucléolo durante interfase y el inicio de mitosis por la unión

Introducción

a su inhibidor Net1. Al inicio de anafase, gracias a la acción de la ruta FEAR, comienza a ser liberada de esta localización y pasa al núcleo, al huso mitótico y al SPB (*Spindle Pole Body*, cuerpo polar del huso, análogo del centrosoma en células humanas) (Azzam et al., 2004; Faust et al., 2013; Stegmeier and Amon, 2004; Stegmeier et al., 2002).

ScCdc14 está implicada en el movimiento de los cromosomas y la elongación del huso en anafase (Higuchi and Uhlmann, 2005). Además, participa en la correcta segregación del ADN ribosomal (rDNA) y las regiones teloméricas a través de la condensina, al reprimir la transcripción de estas regiones mediante la inhibición de la ARN polimerasa I y la ARN polimerasa II, respectivamente (Clemente-Blanco et al., 2009; Clemente-Blanco et al., 2011; D'Amours et al., 2004; Sullivan et al., 2004). Algunos estudios sugieren que también podría participar en la regulación de la citoquinesis, si bien no se han identificado sus sustratos en este proceso ((Bembenek and Yu, 2001; Lippincott et al., 2001; Palani et al., 2012); revisado en (Meitinger et al., 2012)).

5.2 Flp1/Clp1 en *Schizosaccharomyces pombe*

En *S. pombe*, la fosfatasa Cdc14 se conoce como Flp1 (*Fourteen-like phosphatase 1*), también denominada Clp1 (*Cdc-Fourteen-like protein 1*). La identidad de secuencia entre ScCdc14 y Flp1 es de un 36%. A diferencia de su homóloga en *S. cerevisiae*, Flp1 no es una proteína esencial, aunque las células que carecen de ella entran prematuramente en mitosis y se dividen con un tamaño menor a consecuencia de defectos en el ciclo celular. En *S. pombe*, Flp1 regula la entrada en mitosis y es importante durante la salida de la misma, coordinando la división nuclear y la citoquinesis (Cueille et al., 2001; Trautmann et al., 2001). Esta regulación la realiza promoviendo la degradación de Cdc25, un activador esencial de los complejos CDK mitóticos (Esteban et al., 2004; Wolfe and Gould, 2004). Flp1 es importante para la interacción de los microtúbulos con los cinetocoros (Choi et al., 2009). Además, podría intervenir en la segregación de los cromosomas (Chen et al., 2013; Chen et al., 2011; Trautmann et al., 2004) y se ha descrito que regula la formación del septo a través de la ruta SIN (*Septation Initiation Network*, ruta de inicio de la septación o citoquinesis, homóloga de MEN) (Clifford et al., 2008; Cueille et al., 2001; Chen et al., 2013; Mishra et al., 2005; Simanis, 2003; Trautmann et al., 2001).

Flp1 se localiza en el nucléolo y en el SPB hasta profase, momento en el que se dispersa por el núcleo, el huso mitótico y el anillo medial hasta concluir la mitosis (Fu et al., 2009; Khmelinskii et al., 2007). Estos cambios en su localización dependen de un mecanismo diferente al homólogo de la ruta FEAR (Chen et al., 2006). Por otra parte, Flp1 sale del nucléolo y se localiza en el núcleo ante determinados tipos de estrés o daño al ADN, por un mecanismo dependiente de fosforilación por Cds1, Chk1, Pmk1 y Cdk1 según el tipo de daño. Flp1 no sólo contribuye a la activación del *checkpoint*, sino que además parece autorregular su propia localización nucleolar en estas condiciones (Broadus and Gould, 2012; Diaz-Cuervo and Bueno, 2008).

En cuanto a la regulación de su actividad catalítica, se ha demostrado que en mitosis Flp1 se encuentra inhibida por fosforilación por CDKs. En la transición metafase-anafase, la propia fosfatasa tiene capacidad de autodesfosforilación para activarse y participar en la salida de mitosis (Wolfe et al., 2006).

5.3 Fosfatasas Cdc14 en mamíferos

En todos los vertebrados se ha descrito que existen dos isoformas de fosfatasas Cdc14 (A y B). Las funciones y regulación de Cdc14A y Cdc14B en estos organismos aún son poco conocidas, y la mayor cantidad de datos disponibles provienen de estudios en mamíferos.

5.3.1 Fosfatasas Cdc14 murinas

Aunque en ratón existen tanto Cdc14A como Cdc14B, actualmente sólo se ha descrito el ratón KO para Cdc14B. Los ratones KO para Cdc14B son viables y no tienen anomalías aparentes, sin embargo, presentan signos de envejecimiento prematuro. Además, estos ratones acumulan más daño endógeno en el ADN, medido por el aumento de focos de γ -H2AX y 53BP1, lo que explicaría la senescencia prematura. Por otra parte, los ratones que carecen de Cdc14B son menos fértiles que los de tipo silvestre, especialmente en el caso de las hembras, lo que estaría relacionado con el papel de Cdc14B en la meiosis de los oocitos de ratón (Wei et al., 2011). En ellos se ha descrito que Cdc14B regula la reanudación de la meiosis y la transición entre meiosis I y

Introducción

meiosis II, probablemente a través de Fzr1 (Cdh1) (Schindler and Schultz, 2009a; Schindler and Schultz, 2009b).

A nivel celular, los MEFs (Mouse Embrionic Fibroblasts, fibroblastos embrionarios de ratón) procedentes de los ratones KO para Cdc14B tienen una mayor tasa de senescencia a medida que aumenta el número de pases en cultivo (Wei et al., 2011). En contraposición a estos datos, estudios de otro grupo muestran que los MEFs KO no presentan mayor tasa de daño endógeno en el ADN ni problemas en la reparación tras diversos tratamientos. Sin embargo, estos MEFs entran prematuramente en fase S y mitosis cuando reinician el ciclo celular tras haber estado en quiescencia. Este fenotipo parece deberse a una mayor actividad de la ARN polimerasa II, la cual es un sustrato de Cdc14B, que la desfoforila en su región CTD para inhibirla (Guillamot et al., 2011).

Se ha descrito que la sobreexpresión de Cdc14B, pero no la de Cdc14A, induce la transformación de los fibroblastos de ratón NIH3T3 de manera dependiente de su actividad, alterando su morfología y confiriéndoles la capacidad de crecer sin adherencia a un sustrato sólido. Estas células son capaces de formar tumores *in vivo* cuando son inyectadas en ratones desnudos o en embriones de pollo (Chiesa et al., 2011). La capacidad oncogénica de Cdc14B está mediada por la ruta Ras-Mek. Asimismo, la expresión de numerosos genes se ve alterada de manera similar a cuando se sobreexpresa el oncogén H-RasV12, incluyendo aquéllos que codifican para componentes extracelulares, proteínas asociadas a la membrana celular, componentes del citoesqueleto de actomiosina, genes implicados en la interacción célula-célula, el movimiento celular, la morfología y la proliferación, y también genes implicados en la inflamación y la respuesta a heridas (Chiesa et al., 2011).

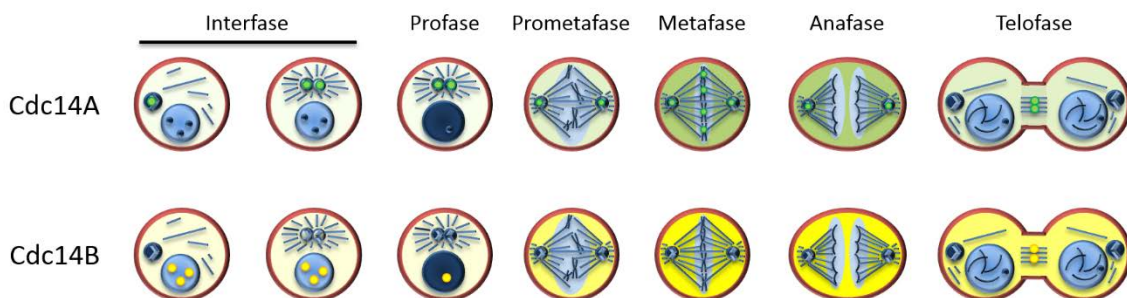
5.3.2 Fosfatasas Cdc14 humanas

En humanos existen dos genes homólogos (Li et al., 1997), hCdc14A y hCdc14B, cuya homología de secuencia es de un 50% (Li et al., 2000). Exclusivamente en homínidos se ha identificado otro miembro de esta familia, denominado hCdc14C o hCdc14B retro, que procede de la retroduplicación génica de hCdc14B. La expresión de hCdc14C se da fundamentalmente en cerebro y testículos, se localiza en microtúbulos y el retículo endoplasmático, y sus funciones hasta el momento son desconocidas (Rosso

et al., 2008). A partir de ahora, nos referiremos únicamente a las dos isoformas mayoritarias y emplearemos los términos generales Cdc14A y Cdc14B.

Las fosfatasas Cdc14 humanas rescatan la falta de ScCdc14 en *S. cerevisiae* (Cho et al., 2005; Li et al., 1997) y de Flp1 en *S. pombe*, lo que indica que al menos algunas de sus funciones están conservadas en los diferentes organismos (Vazquez-Novelle et al., 2005).

Los niveles proteicos y de actividad de Cdc14A y Cdc14B no parecen sufrir cambios relevantes a lo largo del ciclo celular (Kaiser et al., 2002), y se considera que su principal mecanismo de regulación son los cambios en su localización subcelular (Figura I-9). La diferencia más importante entre Cdc14A y Cdc14B, además del dominio C-terminal no conservado, es que Cdc14B presenta una secuencia única de 54 aminoácidos en su dominio N-terminal que es la responsable de que se localice en el nucléolo durante interfase (NoLS, Nucleolar Localization Sequences o secuencia de localización nucleolar), en la cual hay un motivo KKIR fundamental para dicha localización (Mocciaro and Schiebel, 2010). Debido a sus respectivas NES y a la NoLS, durante interfase Cdc14A se localiza en los centrosomas y el citoplasma y Cdc14B en núcleo y nucléolo, mientras que en mitosis ambas proteínas salen de sus respectivas localizaciones y difunden por la célula (Kaiser et al., 2002; Mailand et al., 2002a). La exportación nuclear de ambas formas depende de la exportina Crm1 (Bembenek et al., 2005) (Figura I-9).



I-9. Localización de las fosfatasas Cdc14 humanas: En la figura se refleja la localización de Cdc14A (verde) y Cdc14B (amarillo) durante interfase y las distintas fases de mitosis. La intensidad del color indica la abundancia de la proteína en cada localización.

5.3.2.1 Cdc14A humana

Funciones de Cdc14A

Cdc14A parece estar implicada en el ciclo de división del centrosoma, la segregación cromosómica y la citoquinesis, y su silenciamiento conlleva defectos en estos procesos (Kaiser et al., 2002; Mailand et al., 2002a). Por otra parte, la sobreexpresión de esta proteína produce la separación prematura de los centrosomas, la generación de husos mitóticos supernumerarios y la segregación anormal de los cromosomas, todo ello relacionado con un incremento de la muerte celular. Aún se desconocen los sustratos a través de los cuales afecta a estos procesos. Estos datos sugieren que las funciones de Cdc14A afectan al mantenimiento de la estabilidad genómica, lo que le otorga un papel potencial en la carcinogénesis (Mailand et al., 2002a).

Se ha descrito que los niveles de Cdc14A podrían variar dependiendo del tejido, siendo mayores en cerebro, corazón, intestino delgado y músculo esquelético; moderados en bazo y bajos o indetectables en riñón, hígado, pulmón, testículos y páncreas. Asimismo, hay indicios de que dichos niveles difieren entre distintos tipos de tumores, siendo bajos en melanoma y neuroblastoma y variables en otros tipos tumorales (Paulsen et al., 2006). Se ha comprobado que Cdc14A no aparece frecuentemente mutado ni presenta deleciones en los tumores humanos analizados (Wong et al., 1999). Numerosos estudios sugieren que tanto Cdc14A como Cdc14B podrían estar desreguladas en varios tipos de cáncer, como linfomas de células del manto, cáncer de mama, de próstata y leucemia mieloide aguda (Wu et al., 2008). Por otra parte, se ha observado que altos niveles de Cdc14A son incompatibles con p53 wt en líneas celulares humanas, quizás porque la desregulación de Cdc14A conlleva un aumento de la inestabilidad genómica y las células con p53 competente sufrirían muerte celular (Paulsen et al., 2006). Cdc14A defosforila a p53 y podría estar regulando su función, especialmente en el ciclo de duplicación del centrosoma, proceso en el cual ambas proteínas están implicadas (Paulsen et al., 2006).

Por otra parte, estudios previos de otros grupos y de nuestro laboratorio, han puesto de manifiesto la importancia de Cdc14A en la regulación de la entrada en mitosis.

Las proteínas activadoras de los complejos CDK mitóticos, Cdc25A y Cdc25B, son reguladas negativamente por Cdc14A, por lo que la depleción de la fosfatasa induce la activación de los complejos y la entrada prematura en mitosis (Vazquez-Novelle et al., 2010). En contraposición, la sobreexpresión de Cdc14A produce un retraso en la transición G2/M (Yuan et al., 2007). Estos datos indican que la actividad de Cdc14A se opone a la de los complejos CDK durante la entrada en mitosis. Nuestro trabajo también ha puesto de manifiesto que Cdc14A regula los complejos CDK mitóticos a través de Wee1 (Ovejero et al., 2012). El estudio de esta regulación es uno de los objetivos de este trabajo de tesis.

En los últimos años, numerosos estudios se han centrado en analizar posibles funciones y sustratos de Cdc14A. Las funciones más críticas en células humanas parecen ser las descritas anteriormente, pero se han identificado sustratos a través de los cuales podría estar contribuyendo a la regulación de varios procesos celulares. A continuación detallamos dichos sustratos y su posible implicación en diversos mecanismos de regulación celular.

La sirtuina Sirt2 es una NADC (*NAD-dependent Deacetylase*, desacetilasa dependiente de NAD) implicada en la condensación de la cromatina en la transición G2/M y la regulación de la salida mitosis (Inoue et al., 2007; North and Verdin, 2007; Scolnick and Halazonetis, 2000). Su estabilidad está regulada mediante procesos de fosforilación y desfosforilación, en los que Cdc14A estaría implicada. Además, esta fosfatasa regula a Cdh1 para promover la activación del complejo APC^{Cdh1}, importante para la salida de mitosis, en un proceso que parece conservado desde levaduras hasta humanos. Esta afirmación es controvertida, ya que la depleción de Cdc14A no parece afectar significativamente a la salida de mitosis (Bembenek and Yu, 2001; van Leuken et al., 2009; Wurzenberger and Gerlich, 2011). En este proceso, Cdc14A parece ser activada por fosforilación de Plk1 en Ser³⁵¹ y Ser³⁶³, al producirse la disociación de un puente intramolecular inhibitorio (van Leuken et al., 2009; Yuan et al., 2007). A pesar de que la actividad de Cdc14A no parece variar de manera significativa a lo largo del ciclo celular (Kaiser et al., 2002), la existencia de este mecanismo de regulación directa sugiere que quizás podrían existir otros residuos cuya modificación regule la actividad de Cdc14A según la fase del ciclo celular o en situaciones de estrés o daño.

Introducción

Recientemente se ha identificado a KIBRA (*kidney- and brain-expressed protein*, proteína expresada en riñón y cerebro) como sustrato de Cdc14A. KIBRA es un regulador de la ruta Hippo que controla el crecimiento tisular y la tumorigénesis regulando la proliferación celular y la apoptosis. Es fosforilada por Cdk1 en respuesta a daño en el huso mitótico y desfosforilada posteriormente, estando ambos procesos implicados en el control de la salida de mitosis cuando existe estrés del huso mitótico. Se ha comprobado que esta desfosforilación puede ser llevada a cabo por Cdc14A y Cdc14B *in vitro* (Ji et al., 2012).

La histona metiltransferasa PR-Set7 también es sustrato de las fosfatasas Cdc14 humanas. Esta enzima monometila la Histona H4 y es necesaria para la compactación de la cromatina y la represión transcripcional de genes específicos. También tiene un papel en el control de G2 y debe degradarse para permitir la salida de mitosis. PR-Set7 es fosforilada por los complejos Cdk1-Ciclina B1 desde profase hasta anafase temprana para controlar su estabilidad, esta fosforilación es revertida por las fosfatasas Cdc14 en anafase para promover su degradación mediada por APC/C^{Cdh1} (Wu et al., 2010). También se ha descrito que Cdc14A promueve la estabilización del complejo ERK3-Ciclina D3, implicado en la inducción de una parada en G1 y en procesos de diferenciación celular (Hansen et al., 2008; Tanguay et al., 2010).

Aunque algunos han sido identificados únicamente *in vitro*, estos sustratos sugieren que Cdc14A no sólo estaría regulando la entrada en mitosis, sino también la salida de mitosis. Sin embargo, no se ha descrito que la desregulación de la fosfatasa afecte significativamente a esta fase del ciclo, por lo que sería necesario corroborar la regulación de estas proteínas *in vivo* y profundizar en el estudio de su posible papel durante la salida de mitosis en combinación con Cdc14B u otras fosfatasas.

Regulación de Cdc14A

Como mencionamos antes, los mecanismos de regulación de Cdc14A aún son poco conocidos y se considera que afectan principalmente a cambios en su localización. Durante interfase, la mayor parte de la población de Cdc14A se encuentra en los centrosomas y en el citoplasma (Bembenek and Yu, 2001; Mailand et al., 2002a). La región NES comprende los residuos 352 a 367, responsables de su asociación a los

centrosomas, aunque tanto la región anterior como posterior a dicha NES parecen participar también en esta asociación (Kaiser et al., 2002; Mailand et al., 2002a). Además, Cdc14A posee una NLS (Nuclear Localization Sequences, secuencia de localización nuclear) (aminoácidos 78 a 91), de manera que es necesario un transporte activo de la fosfatasa fuera del núcleo para que pueda localizarse en los centrosomas (Kaiser et al., 2002). Durante mitosis, la fosfatasa sale de su localización centrosomal, aunque algunos autores sostienen que una pequeña población sigue estando presente en ellos, difunde por toda la célula y se concentra en los centrómeros de los cromosomas, quizás como consecuencia de su interacción con Plk1 (Yuan et al., 2007). En las etapas finales de mitosis, durante anafase y telofase, Cdc14A se encuentra en los centrómeros, los polos y la zona central del huso mitótico (Gruneberg et al., 2004)(figura I-9).

En cuanto a su actividad, se ha descrito que no varía de manera significativa a lo largo del ciclo celular, siendo ligeramente mayor durante fase S y final de mitosis que en el resto del ciclo (Kaiser et al., 2002).

5.3.2.2 Cdc14B humana

Funciones de Cdc14B

Se ha implicado a Cdc14B en el mantenimiento de la estructura nuclear (Nalepa and Harper, 2004), en la salida de mitosis a través de SIRT2 (Dryden et al., 2003), y la duración de G1 a través de Skp2 (Rodier et al., 2008). La regulación de SIRT2, una desacetilasa de tubulina, sugiere que Cdc14B también podría estar implicada en la acetilación de microtúbulos. En este sentido, se ha descrito que Cdc14B participa en la regulación de la dinámica del huso mitótico de manera independiente de su actividad catalítica, a través de su unión a los microtúbulos, promoviendo la agrupación y estabilización de éstos (Cho et al., 2005). Además, se le atribuye un papel en el ciclo de duplicación del centrosoma (Wu et al., 2008), lo que concuerda con su posible papel como supresor tumoral, ya que las aberraciones en el número y estructura de los centrosomas están implicadas en el desarrollo y progresión de tumores (Saunders, 2005). También se ha mostrado que la falta de Cdc14B produce un aumento en el número de centrosomas en células tumorales y no tumorales, y algunos estudios

Introducción

apuntan que los niveles de Cdc14B estarían disminuidos en células tumorales (Wu et al., 2008). Sin embargo, estos datos resultan contradictorios respecto a los obtenidos en ratón y comentados anteriormente, en los que altos niveles de esta fosfatasa inducen transformación celular y confieren capacidad para formar tumores (Chiesa et al., 2011).

Por otra parte, hay datos que indican que Cdc14B difunde por el núcleo cuando se produce un daño al ADN en G2, ayudando a establecer el *checkpoint* que permite la reparación de dicho daño. En este proceso, Cdc14B regula la activación de Cdh1, que unida a APC/C produce la degradación de Plk1 y, por tanto, impide la entrada en mitosis en presencia de daño (Bassermann et al., 2008). La función de Cdc14B tras un daño al ADN parece depender en parte de la actividad de Chk1, que fosforila a Cdc14B probablemente para inducir su salida del nucléolo (Peddibhotla et al., 2011). Recientemente se han generado y descrito líneas KO simples para Cdc14A y Cdc14B que presentan menor capacidad para reparar el daño al ADN tanto endógeno como exógeno, lo que se traduce en un aumento de los focos de γ -H2AX e hipersensibilidad a la irradiación (Mocciaro et al., 2010).

Regulación de Cdc14B

Como ya se ha explicado previamente, Cdc14B se encuentra en el nucléolo de células en interfase (Kaiser et al., 2002; Mailand et al., 2002a). Durante mitosis cambia su localización, en anafase se encuentra en la zona central del huso mitótico y en los cromosomas, y en telofase y citoquinesis se localiza en el cuerpo medio (Berdougo et al., 2008; Cho et al., 2005) (figura I-9). Aunque Cdc14B se encuentra mayoritariamente en el nucléolo, algunos estudios apuntan a que una pequeña fracción podría estar también asociada a los centrosomas y a filamentos nucleares (Cho et al., 2005; Kaiser et al., 2002; Mailand et al., 2002a; Nalepa and Harper, 2004). Su localización en centrosomas parece depender de su propia actividad catalítica.

En general, se desconocen los mecanismos que gobiernan estos cambios en su localización y si existe alguna regulación directa de su actividad a lo largo del ciclo.

En conclusión, las fosfatasas Cdc14 participan en la regulación del ciclo celular, especialmente en la entrada en mitosis. Además, parecen estar implicadas en otros procesos relacionados con la activación de *checkpoints* y la reparación del daño al ADN, así como en procesos tumorales. No obstante, algunas de sus funciones no han sido estudiadas en detalle y aún se desconocen los mecanismos que controlan a las propias fosfatasas. Por todo ello, es importante profundizar en el estudio del papel y la regulación de las fosfatasas Cdc14 en células humanas.

OBJETIVOS

1. Analizar la posible regulación de Wee1 por la fosfatasa Cdc14A a la entrada en mitosis en células humanas.
2. Estudiar la regulación dependiente de fosforilación de Cdc14A en células humanas.

RESULTADOS

En todos los organismos estudiados, los ortólogos de Cdc14 contrarrestan la actividad CDK desfosforilando sus sustratos para regular mayoritariamente procesos relacionados con el ciclo celular. En *S. cerevisiae*, Cdc14 tiene un papel esencial en el control de la salida de mitosis, sin embargo, esta función no parece estar conservada en otros eucariotas. En el caso de humanos, se cree que Cdc14A podría intervenir en el control de la salida de mitosis a través de Cdh1, pero no existen datos *in vivo* que corroboren esta hipótesis, por lo que sus funciones conocidas se limitan al ciclo de duplicación y segregación de los centrosomas y a la regulación de la entrada en mitosis (Kaiser et al., 2002; Mailand et al., 2002a; Vazquez-Novelle et al., 2010).

Al inicio de este trabajo, por datos de nuestro grupo se sabía que dicha regulación se ejerce a través de las fosfatasas Cdc25A y Cdc25B para impedir la activación temprana de los complejos Cdk1-Ciclina B1 (Vazquez-Novelle et al., 2010), pero se desconocía si existía algún otro mecanismo por el cual Cdc14A podía estar regulando la mitosis u otro proceso relacionado con la progresión por el ciclo celular.

Dada la importancia crucial de la regulación de los complejos CDK mitóticos, nuestro primer objetivo fue analizar si Cdc14A está regulándolos a través de varias vías, lo que supondría un mecanismo más preciso e importante para controlar la entrada en mitosis. Como segundo objetivo, nos planteamos estudiar la regulación dependiente de fosforilación de Cdc14A en células humanas, especialmente la posibilidad de que estuviera siendo regulada por los propios complejos durante la entrada y progresión por mitosis.

REGULACIÓN DE LA ENTRADA EN MITOSIS POR Cdc14A A TRAVÉS DE Wee1

En estudios previos de nuestro laboratorio describimos que la falta de Cdc14A acelera la entrada en mitosis debido a la hiperactivación de Cdc25A y Cdc25B, reguladores positivos de los complejos Cdk1-Ciclina B1 (Vazquez-Novelle et al., 2010). Basándonos en estos resultados, decidimos analizar si las quinasas inhibidoras de Cdk1, Wee1 y Myt1, implicadas en el mecanismo de control de la activación de los complejos CDK a la entrada en mitosis, son también sustratos de Cdc14A. A lo largo de nuestro trabajo no hemos visto relación entre Cdc14A y Myt1, por lo que nos centramos en la regulación de Wee1 por Cdc14A.

La depleción de Cdc14A produce una disminución de los niveles de Wee1

El principal control de la actividad de Wee1 a la entrada en mitosis en células humanas consiste en regular sus niveles proteicos a través de fosforilaciones que inducen su degradación (Watanabe et al., 2005; Watanabe et al., 2004). Nos planteamos que Cdc14A pudiera ser la fosfatasa que regulara estas fosforilaciones como parte del mecanismo de control de los complejos CDK mitóticos. Para estudiar esta posibilidad, analizamos los niveles de Wee1 en células U2OS (osteosarcoma humano) deplecionadas para Cdc14A mediante transfección con siRNA (*short interfering Ribonucleic Acid*, ARNs cortos de interferencia) específicos previamente validados para Cdc14A pero sin efecto sobre la fosfatasa homóloga Cdc14B (Vazquez-Novelle et al., 2010). Como control negativo utilizamos siRNA frente a Luciferasa ("siRNA Control"). Dado que los anticuerpos disponibles no permiten la detección de los niveles endógenos de Cdc14A, realizamos RT-PCR (*Real Time-Polymerase Chain Reaction*, PCR en tiempo real) para comprobar la eficiencia del silenciamiento de la expresión de esta proteína mediante el análisis de los niveles de mRNA (*messenger Ribonucleic Acid*, ARN mensajero) presentes en las células. Como puede verse en la gráfica mostrada en la figura 1A, 48h después de la transfección, los siRNA Cdc14A han producido un silenciamiento importante de su expresión. Además, observamos una disminución significativa de los niveles proteicos de Wee1 respecto al control (figura 1A, derecha). Esta disminución correlaciona con una menor fosforilación de Cdk1 en Tyr¹⁵, principal sustrato de Wee1, que es un fiel reflejo de la falta de la proteína. El mismo resultado fue observado cuando deplecionamos

Cdc14A en células no tumorales BJ-TERT (fibroblastos humanos inmortalizados mediante la sobreexpresión de la telomerasa) (figura 1B). En conjunto estos resultados sugieren que la depleción de Cdc14A podría estar afectando a la estabilidad de Wee1 en células humanas.

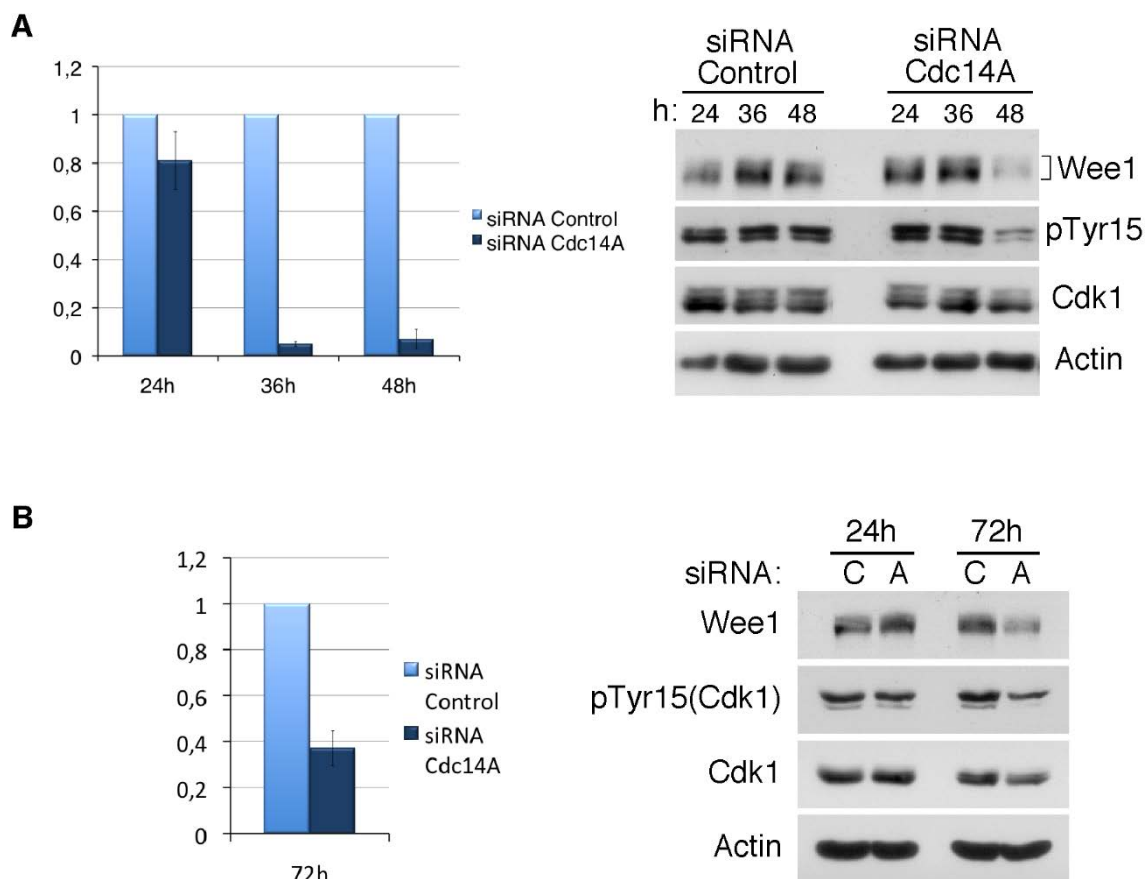


Figura 1. La depleción de Cdc14A produce una reducción de los niveles de Wee1. **A)** Células U2OS se transfectaron con siRNAs Control (Luciferasa) o frente a Cdc14A y se recogieron muestras tras 24, 36 y 48h. Las proteínas indicadas se analizaron mediante *western blot*. La actina se utilizó como control de carga. Los niveles de mRNA de Cdc14A se analizaron mediante RT-PCR con medidas por triplicado. Se consideró como valor 1 la cantidad de mRNA Cdc14A presente en las muestras control de cada tiempo y se refirió a ella la cantidad del mismo mRNA presente en las muestras deplecionadas para Cdc14A. **B)** Células BJ-TERT se transfectaron en las mismas condiciones que en (A) y se tomaron muestras para análisis mediante *western blot* y RT-PCR.

Al analizar todos nuestros experimentos de transfección con siRNAs en células U2OS, observamos que la depleción de la fosfatasa en esta línea celular siempre alcanza niveles similares a los mostrados en la figura 1A, por lo tanto, a partir de ahora no

Resultados

mostraremos las gráficas de cuantificación del mRNA en los experimentos realizados con estas células para evitar repeticiones innecesarias.

Wee1 es una proteína con una vida media corta y cuya degradación por el proteasoma es dependiente de fosforilación (Watanabe et al., 2005; Watanabe et al., 2004), por lo que nuestros resultados sugerían que la falta de Cdc14A podía estar incrementando su degradación mediada por fosforilación. Para corroborar esta hipótesis, transfectamos células U2OS con siRNA Control o frente a Cdc14A y tras 42h de transfección, tratamos las células deplecionadas para Cdc14A con el inhibidor del proteasoma MG132 durante 6h, tiempo suficiente para impedir la degradación de proteínas ubiquitinadas sin comprometer la viabilidad celular (figura 2). De esta manera, si la falta de la fosfatasa estuviera aumentando la degradación de Wee1 a nivel proteico, el tratamiento con MG132 rescataría ese efecto. Como puede observarse, tras el tratamiento con siRNA Cdc14A y MG132 sus niveles son cercanos a las condiciones control. Esto indica que la falta de Cdc14A afecta a la degradación de Wee1 por el proteasoma.



Figura 2. El silenciamiento de Cdc14A induce la degradación de Wee1. Cultivos asincrónicos de U2OS se transfectaron con siRNA Control o siRNA Cdc14A. Tras 42h de transfección, se añadió MG132 (20 μ M) durante 6h. Los niveles de Wee1 y la fosforilación de pTyr¹⁵(Cdk1) se analizaron mediante *western blot*. La actina se utilizó como control de carga.

Los siRNA utilizados para Cdc14A ya habían sido validados como específicos frente a esa isoforma de la fosfatasa, pero para cerciorarnos de que el fenotipo observado se debe exclusivamente a la depleción de Cdc14A y no a un efecto inespecífico de los mismos independiente de Cdc14A y Cdc14B, llevamos a cabo experimentos de rescate.

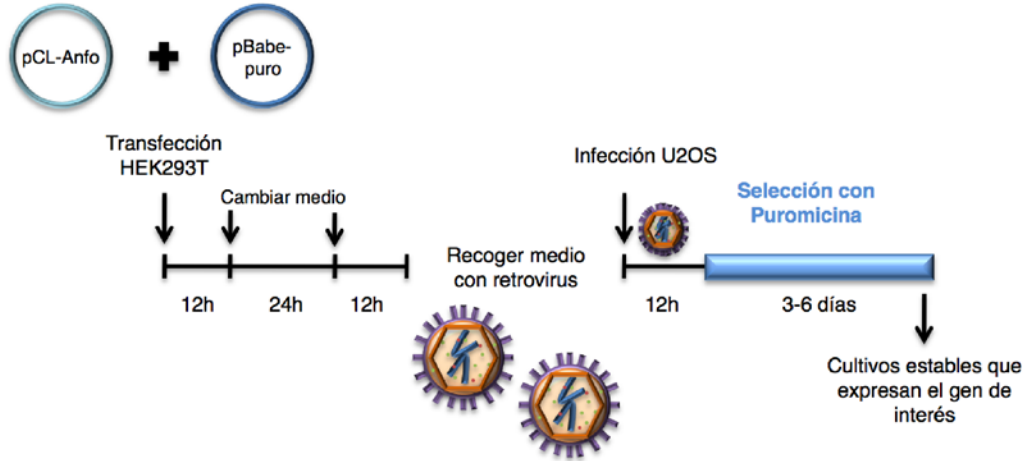
Para ello, utilizamos una construcción de Cdc14A silvestre (Cdc14A wt o *wild type*) y una construcción resistente a nuestro siRNA (Cdc14A (R)) generada mediante mutagénesis dirigida. Esta construcción contiene cuatro mutaciones silenciosas en la zona de reconocimiento del siRNA, de manera que éste no puede anillarse con la cadena de mRNA de Cdc14A por falta de complementariedad entre bases (figura 3A). Con estas construcciones originamos tres líneas celulares estables de U2OS mediante infección con retrovirus: U2OS Control (infectadas con el plásmido vacío), Cdc14A wt y Cdc14A (R) (el proceso de infección se esquematiza en la figura 3B y se detalla en Materiales y Métodos). Transfectamos cada una de estas líneas con siRNA Control o siRNA Cdc14A, tomamos muestras a distintos tiempos y analizamos mediante *western blot* las proteínas indicadas. Como puede verse en la figura 3C, en las células U2OS Control no existen niveles detectables de Cdc14A endógena (carriles 1 a 6), mientras que en las que expresan Cdc14A wt o Cdc14A (R) la proteína ectópica es detectable a nivel bioquímico (carriles 7 a 18). Por otra parte, observamos que los siRNA Cdc14A son capaces de silenciar la expresión de Cdc14A wt por debajo de niveles detectables (carriles 10, 11 y 12) pero no en el caso de Cdc14A (R) (carriles 16, 17 y 18). Además, los niveles de Wee1 correlacionan con los de Cdc14A, de modo que en las células U2OS Control y U2OS Cdc14A wt la transfección con siRNA Cdc14A produce una disminución significativa de Wee1. Sin embargo, en el caso de aquéllas que expresan Cdc14A (R) vemos que los niveles de Wee1 se mantienen relativamente constantes. Estos datos muestran que la falta de Cdc14A produce la degradación de Wee1 de manera específica y que este efecto puede ser rescatado al introducir en las células una forma de Cdc14A resistente al silenciamiento.

Resultados

A

Cdc14A wt 5'-AGAACAGGGGAC**AT**TGAT**AG**CGCTG**TT**TATGTAATG-3'
Cdc14A(R) 5'-AGAACAGGGGAC**CC**TGAT**CG**CGCTG**CT**TATGTAATG-3'
 R284 T285 G286 T287 L288 I289 A290 C291 Y292 V293 M294

B



C

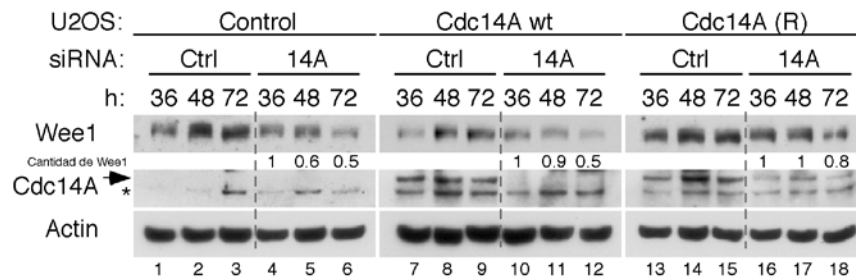


Figura 3. La degradación de Wee1 es dependiente de la falta de Cdc14A. **A)** Comparación entre la secuencia de Cdc14A wt y el mutante Cdc14A (R) resistente a los siRNA Cdc14A. Los residuos en los que se han introducido mutaciones puntuales se destacan en azul. En la parte inferior se muestran los aminoácidos para los que codifica cada codón, que no experimentan cambios a pesar de las mutaciones generadas. **B)** Esquema del proceso de generación de líneas estables mediante infección con retrovirus. Las células HEK293T (riñón embrionario humano) se utilizaron para producir partículas víricas con capacidad infecciosa y las células U2OS se infectaron con dichas partículas para introducir en ellas la construcción de interés. **C)** Las líneas U2OS estables Control, Cdc14A wt y Cdc14 (R) se transfectaron con los siRNA Control (Ctrl) o frente a Cdc14A (14A). (h) indica las horas post-transfección. La flecha indica la banda correspondiente a Cdc14A mientras que (*) indica que la banda es inespecífica. Para facilitar la interpretación del resultado, debajo del panel de Wee1 se muestra la cuantificación de la cantidad de Wee1 en cada muestra normalizada frente a la actina, considerando 1 como la cantidad de Wee1 a tiempo inicial. Esta cuantificación se realizó con el programa *Quantity One*.

La depleción de Cdc14A acelera la degradación de Wee1 en la transición G2/M

En la transición G2/M, Wee1 y Cdc14A se oponen a la activación de los complejos CDK (Vazquez-Novelle et al., 2010; Watanabe et al., 2005; Watanabe et al., 2004). Como parte de este mecanismo de inhibición, decidimos estudiar si Cdc14A, además de regular a las fosfatasas Cdc25, también podría estar regulando a Wee1 durante la entrada en mitosis controlando su degradación dependiente de fosforilación. Para ello, sincronizamos células U2OS en G1/S mediante un doble tratamiento con timidina y transfección con los correspondientes siRNA (esquema del experimento en figura 4A). En el momento de liberar del segundo bloqueo, tomamos muestras para análisis por citometría de flujo y *western blot*, siendo el tiempo 0 el correspondiente al bloqueo en G1/S y los posteriores a las horas indicadas de liberación en presencia de nocodazol. Como marcador de la acumulación de células en mitosis analizamos mediante citometría de flujo el porcentaje de células positivas para la Serina¹⁰ de HH3 (figura 4B).

Mediante *western blot* (figura 4B) observamos que a tiempo 0h (G1/S) la cantidad y el estado de fosforilación de Wee1 en las células control y siRNA Cdc14A son idénticos. Sin embargo, a medida que estas células progresan por G2 y entran en mitosis, observamos que en aquéllas en que Cdc14A se ha silenciado, Wee1 se hiperfosforila y se degrada más rápidamente. Tras la liberación de timidina, el porcentaje de células pSer¹⁰(HH3) positivas aumenta considerablemente, confirmando la correcta sincronización y progresión por G2 (figura 4B). Se corrobora además que la falta de Cdc14A acelera la entrada en mitosis, como se observa al comparar los porcentajes de células pSer¹⁰(HH3) positivas que se van acumulando en los distintos tiempos. El efecto sobre Wee1 podría deberse tanto a la falta de desfosforilación directa de Wee1 por Cdc14A como a la activación prematura de los complejos Cdk1-Ciclina B1 debida a una hiperactivación de las fosfatasas Cdc25. A pesar de que es difícil discriminar entre estas dos posibilidades, un dato que podría apuntar a un efecto directo sobre Wee1 es saber si ésta es sustrato de Cdc14A.

Resultados

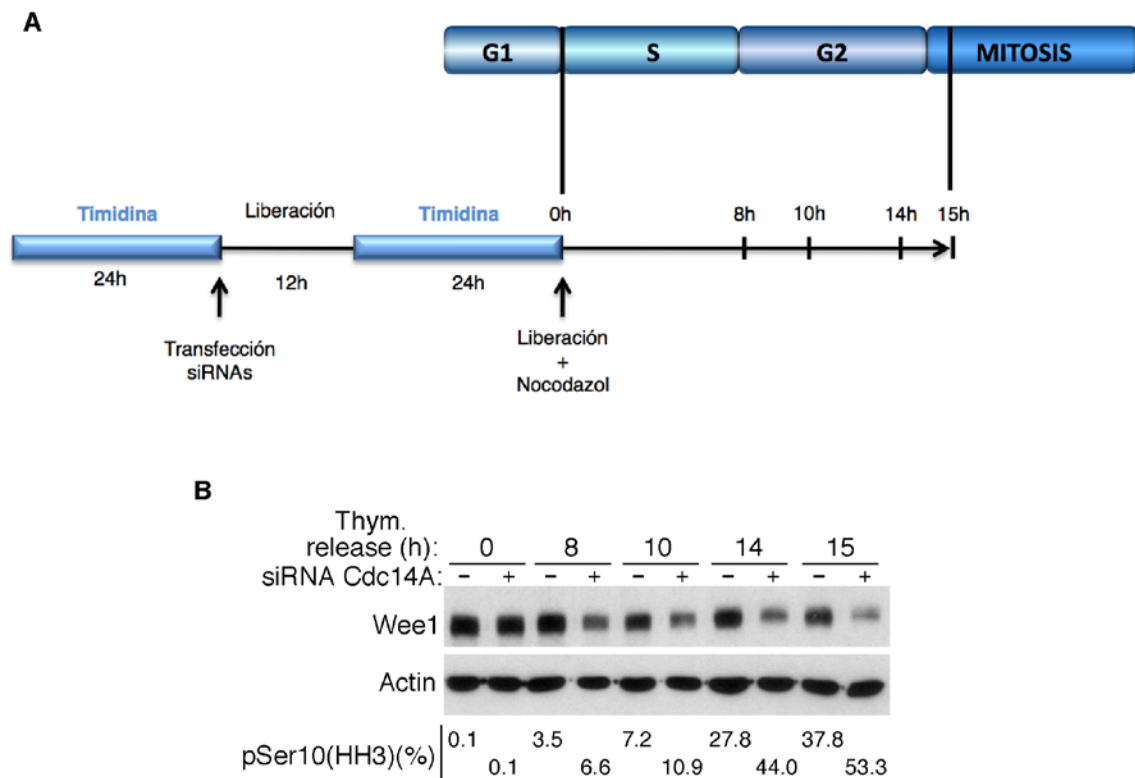


Figura 4. La depleción de Cdc14A acelera la degradación de Wee1 durante la transición G2/M. A) Células U2OS se sincronizaron en G1/S mediante un doble tratamiento con timidina (2,5mM) y posterior liberación en presencia de nocodazol (50ng/ml). Tras el primer bloqueo, se transfectaron con siRNA Control o siRNA Cdc14A. **B)** Los niveles y movilidad electroforética de Wee1 en estas células se analizaron mediante *western blot* a los tiempos indicados. La progresión por G2 y entrada en mitosis se comprobó mediante FACS con anti-pSer¹⁰(HH3).

La sobreexpresión de Cdc14A produce la defosforilación de Wee1

La depleción de Cdc14A acelera la fosforilación y degradación de Wee1, por lo que pensamos que un aumento en los niveles de la fosfatasa debería tener el efecto opuesto. Para analizar esta posibilidad, utilizamos clones estables de U2OS que mediante el sistema inducible Tet-Off expresan Myc-Cdc14A wt o Myc-Cdc14A(PD) (*Phosphatase Dead* o fosfatasa muerta, inactiva por una mutación puntual Cys²⁷⁸Ser en el dominio catalítico). Estas células proceden del laboratorio del Dr. Jiri Lukas y fueron descritas en Mailand et al., 2002. En este sistema, la presencia del antibiótico tetraciclina (T+) en el medio de cultivo reprime la expresión de Myc-Cdc14A wt o Myc-Cdc14A(PD), mientras que su ausencia (T-) la induce. El empleo de estos clones permite una sobreexpresión rápida y homogénea de la fosfatasa en todo el cultivo en el momento deseado. De este modo, mantuvimos células en condiciones de represión (T+) o indujimos la

sobreexpresión de Myc-Cdc14A o Myc-Cdc14A(PD) mediante la eliminación de la tetraciclina del medio de cultivo (T-). En la figura 5A puede verse que en condiciones control (T+) los niveles de Wee1 no se ven afectados y su estado de fosforilación es idéntico tanto en las células U2OS wt como en los clones Myc-Cdc14A wt y Myc-Cdc14A(PD). Sin embargo, la sobreexpresión de Myc-Cdc14A wt (T-) produce un marcado cambio en la movilidad electroforética de Wee1 que Myc-Cdc14A(PD) no es capaz de producir, lo que indica que es dependiente de la actividad catalítica de la fosfatasa. Con el fin de corroborar que este cambio es debido a desfosforilación, inmunoprecipitamos Wee1 de extractos procedentes del clon Myc-Cdc14A wt en condiciones (T+) y (T-), tratamos dichos inmunoprecipitados con fosfatasa lambda (λ PP) y los comparamos con inmunoprecipitados sin tratar. Como se observa en la figura 5B, la forma de Wee1 que migra más rápidamente debido a la sobreexpresión de la fosfatasa coincide con su forma desfosforilada.

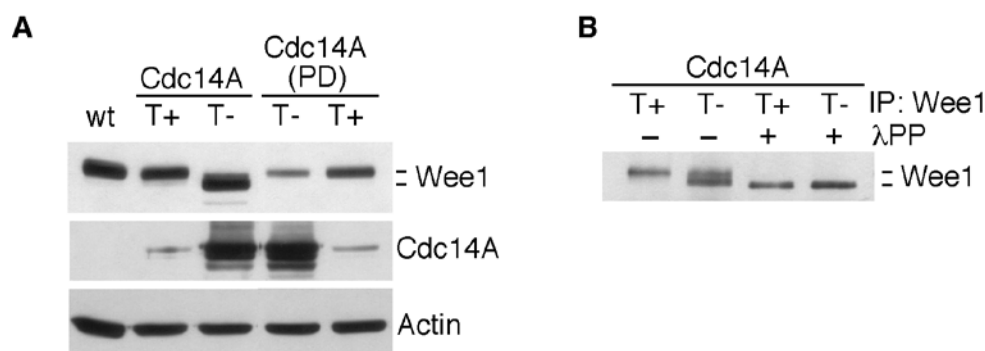


Figura 5. La sobreexpresión de Cdc14A produce la desfosforilación de Wee1. A) Células U2OS Myc-Cdc14A wt o Myc-Cdc14A(PD) se mantuvieron en condiciones de represión (T+) o inducción (T-) de la expresión del transgén, como control se utilizaron células U2OS wt. El estado de fosforilación de Wee1 en estas muestras se analizó mediante *western blot*. Las barras en el lateral (=) indican las formas fosforilada y desfosforilada de la proteína. **B)** Wee1 endógena se inmunoprecipitó (IP:Wee1) de células U2OS Myc-Cdc14A wt en condiciones de represión (T+) o inducción (T-). La mitad de cada inmunoprecipitado se incubó *in vitro* con la fosfatasa lambda (+ λ PP).

Consideramos importante comprobar que la desfosforilación de Wee1 por Cdc14A también se da en otros tipos celulares. Mediante transfecciones transitorias de Myc-Cdc14A wt o Myc-Cdc14A(PD) en células HEK293T y HCT116 (cáncer colorrectal humano), comprobamos que en ambas líneas celulares la fosfatasa es capaz de desfosforilar a Wee1 (figuras 6A y 6B respectivamente), si bien el efecto no es tan

Resultados

dramático como el observado anteriormente, lo que indica que este mecanismo de regulación se da independientemente del tipo celular.

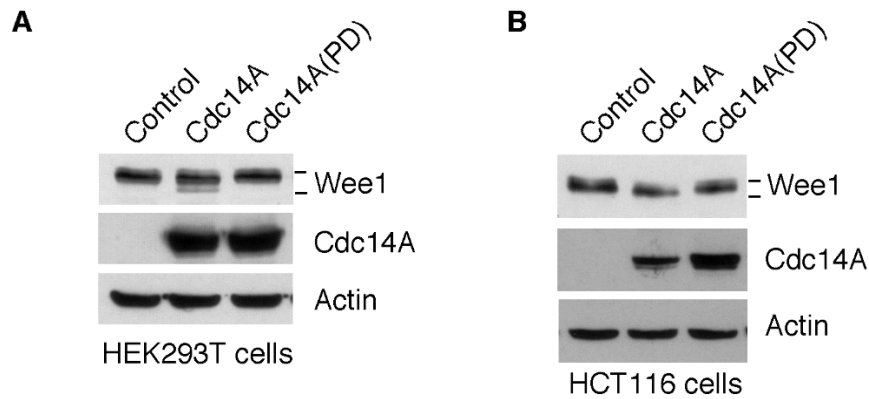


Figura 6. La desfosforilación de Wee1 por Cdc14A es independiente del tipo celular. Células HEK293T (A) y HCT116 (B) se transfectaron con Myc-Cdc14A wt o la forma inactiva Myc-Cdc14A(PD). Tras 48 horas se recogieron las células, se lisaron y los extractos se analizaron mediante *western blot*.

A continuación, analizamos el efecto de la sobreexpresión de Cdc14 sobre Wee1 en la transición G2/M. Para ello, sincronizamos células U2OS Myc-Cdc14A wt en G1/S mediante un doble bloqueo con timidina. En el momento de la liberación, indujimos la sobreexpresión de Myc-Cdc14A wt (Tet-) o mantuvimos las condiciones control (Tet+) (esquema en figura 7A). Recogimos muestras a distintos tiempos y analizamos mediante electroforesis el estado de fosforilación de Wee1. Como se puede observar en la figura 7B (izquierda), la sobreexpresión de Cdc14A produce una marcada desfosforilación de Wee1 en todos los tiempos analizados, lo que indica que durante la entrada en mitosis la actividad de Cdc14A es capaz de regular el estado de fosforilación de Wee1. Además, mediante el análisis por citometría de flujo (figura 7B, derecha) observamos que, como ha sido descrito con anterioridad (Vazquez-Novelle et al., 2010), esta sobreexpresión produce un importante retraso en la entrada y progresión por mitosis respecto a las condiciones control, ya que tras 14 horas de liberación, la mayoría de las células control han completado la mitosis y están de nuevo en G1, mientras que aquellas que sobreexpresan Cdc14A se encuentran acumuladas en G2/M.

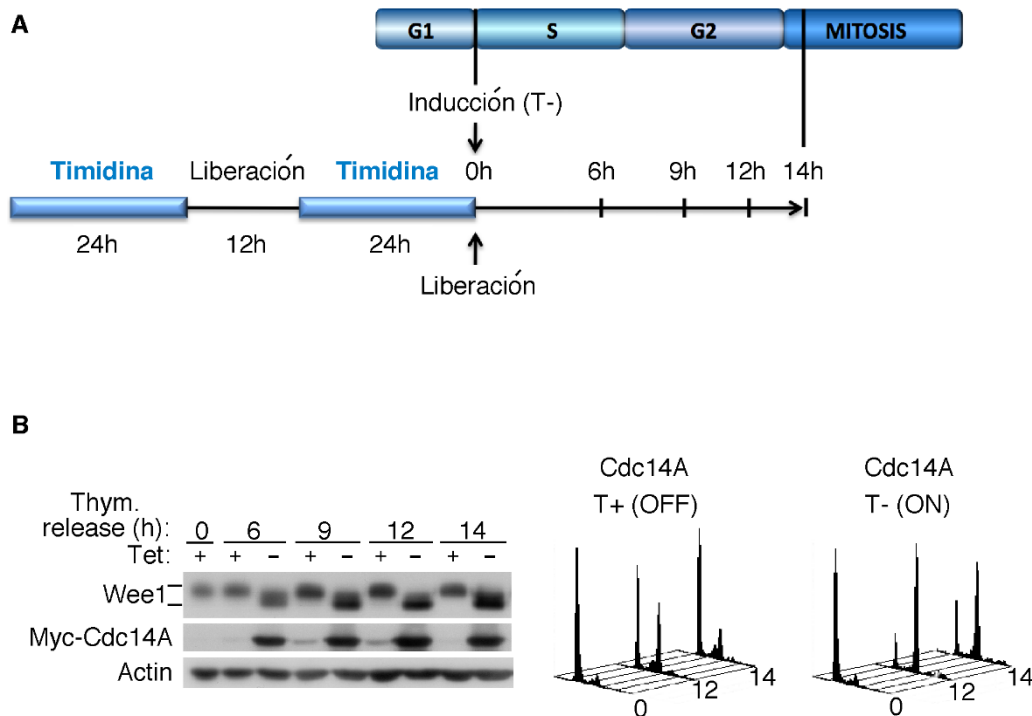


Figura 7. La sobreexpresión de Cdc14A produce la desfosforilación de Wee1 en la transición G2/M. **A)** Esquema de la sincronización, inducción de la expresión de Cdc14A (T-) y tiempos a los que se recogieron muestras para su análisis. **B)** Las muestras tratadas como se explica en (A) se analizaron mediante *western blot* y citometría de flujo.

Para descartar que la desfosforilación de Wee1 sea consecuencia de un efecto indiscriminado de la sobreexpresión de Myc-Cdc14A wt sobre cualquier sustrato de CDKs, analizamos en primer lugar el efecto de Cdc14A sobre la quinasa mitótica Nek9, un sustrato de CDKs conocido y cuya localización también es centrosomal (Bertran et al., 2011), como la de Wee1 (Baldin and Ducommun, 1995) y Cdc14A (Kaiser et al., 2002; Mailand et al., 2002a). Comprobamos que su estado de fosforilación no se ve afectado por la sobreexpresión de Cdc14A (figura 8A). Analizamos también el efecto de la sobreexpresión de Cdc14A en la transición G2/M sobre todos los sustratos de CDKs mediante un anticuerpo que reconoce Serinas fosforiladas por CDKs (pSer(CDKs)). Para ello, sincronizamos y tratamos las células como indicamos anteriormente en la figura 7A. De esta manera comprobamos que Myc-Cdc14A wt no actúa de forma indiscriminada sobre sustratos de los complejos CDK, lo que sugiere que la desfosforilación de Wee1 es específica (figura 8B).

Resultados

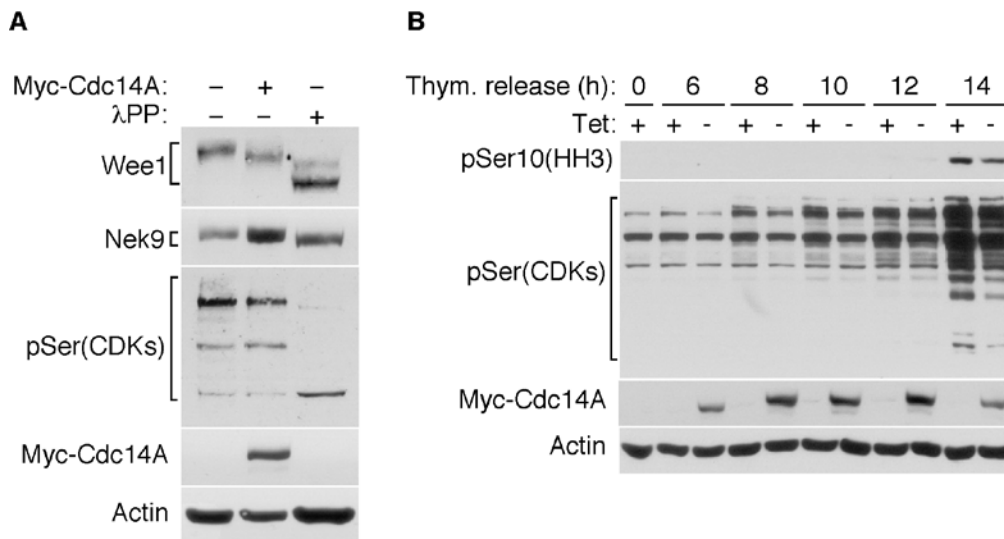


Figura 8. La sobreexpresión de Cdc14A desfosforila a Wee1 de manera específica. A) Se recogieron cultivos asincrónicos en condiciones control (-) o tras 24h de sobreexpresión de Myc-Cdc14A wt (+). Las células se lisaron y 40 μ g de extracto control se incubaron con λ PP. Las muestras tratadas y no tratadas se analizaron mediante electroforesis para las proteínas indicadas. **B)** Células U2OS Myc-Cdc14A wt se sincronizaron mediante un doble bloqueo con timidina y posterior liberación en presencia de nocodazol, en condiciones de inducción o no inducción de la expresión de Cdc14A wt. Las muestras se tomaron a los tiempos indicados y se analizaron mediante *western blot*.

Dado que en vertebrados existen dos isoformas de Cdc14 con alta homología de secuencia, decidimos analizar si Wee1 también podría ser un sustrato de Cdc14B. Para ello, transfectamos células HEK293T con Myc-Cdc14A wt, Myc-Cdc14B wt o sus respectivas formas inactivas (PD). La expresión ectópica de Myc-Cdc14B wt produce una desfosforilación de Wee1 muy similar a la producida por Myc-Cdc14A, mientras que las formas inactivas de las dos isoformas no afectan a su movilidad electroforética, lo que sugiere que Wee1 es sustrato de ambas fosfatasas (figura 9A). Como control adicional de la especificidad de esta desfosforilación por las fosfatasas Cdc14, analizamos en células HEK293T el efecto sobre Wee1 de la sobreexpresión de otras fosfatasas de especificidad dual como son PTEN, Cdc25A y Cdc25C. Ninguna de estas fosfatasas afecta al estado de fosforilación de Wee1, descartando un efecto inespecífico debido a la sobreexpresión de cualquier fosfatasa (figuras 9A y 9B).

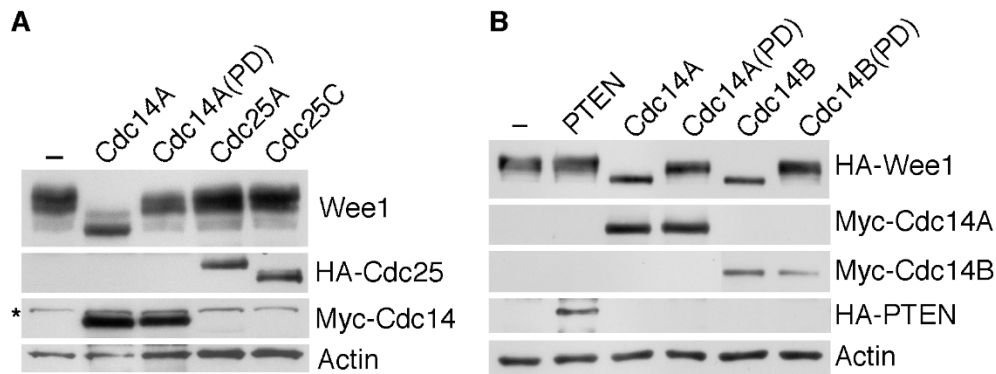


Figura 9. La desfosforilación de Wee1 en condiciones de sobreexpresión es específicamente llevada a cabo por fosfatasas Cdc14. A, B) Células HEK293T se co-transfectaron con HA-Wee1 y las fosfatasas indicadas etiquetadas con HA o Myc. Tras 40 horas de transfección, se recogieron las células y los extractos se analizaron con anti-HA o anti-Myc para detectar las proteínas ectópicas correspondientes.

Para estudiar la posibilidad de que Wee1 sea sustrato de Cdc14B, analizamos el efecto de la depleción de Cdc14B sobre la estabilidad y estado de fosforilación de Wee1. Para ello utilizamos células HCT116 $Cdc14B^{flox/flox}$ cedidas por el laboratorio del Dr. Prasad V. Jallepalli. Estas células poseen el exón 2 del *locus* Cdc14B flanqueado por sitios *loxP*, de manera que adenovirus que contienen la Cre recombinasa (AdCre) producen la escisión de dicho exón y por tanto no se produce una proteína Cdc14B funcional, lo que es equiparable a una deleción de la misma (descritas en Berdougou et al., 2008). Tras 48 y 72h de infección de estas células con los adenovirus con la Cre recombinasa, analizamos los niveles de mRNA Cdc14B mediante RT-PCR y comprobamos que con este sistema su depleción es cercana al 97% (figura 10A). Al analizar los extractos procedentes de estas células mediante *western blot*, no observamos ningún efecto destacable sobre los niveles de Wee1, por lo que concluimos que Cdc14A y Cdc14B podrían regular a Wee1 de distinta forma (figura 10B).

Resultados

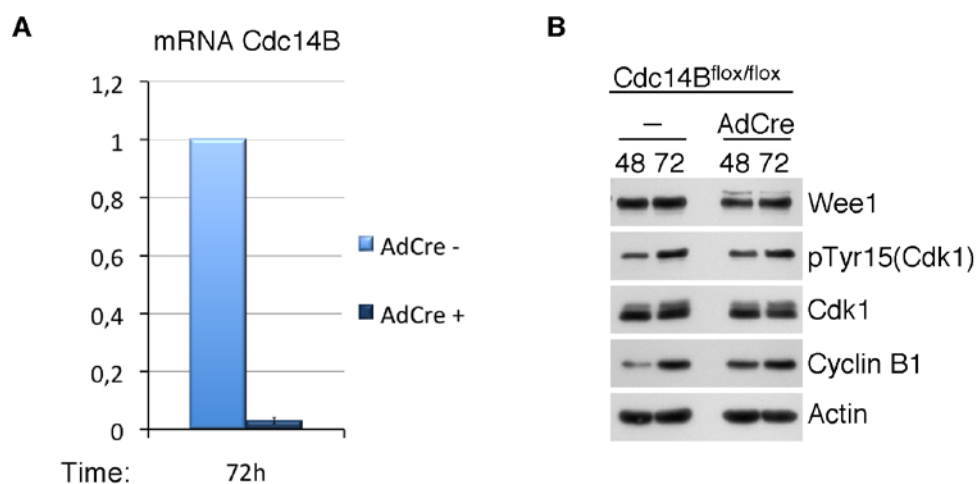


Figura 10. La depleción de Cdc14B no afecta a la estabilidad de Wee1. Se infectaron células HCT116 Cdc14B^{flox/flox} con adenovirus portadores de la Cre recombinasa (AdCre) y se recogieron tras 48 y 72h de infección. Las muestras se analizaron mediante RT-PCR para determinar la cantidad de mRNA Cdc14B tras la infección (A) y *western blot* para las proteínas indicadas (B).

Cdc14A interacciona con Wee1 a través de su dominio amino

Puesto que nuestros datos sugieren que Wee1 podría ser un sustrato directo de Cdc14A, decidimos estudiar esta hipótesis. Como primera aproximación, analizamos la posible interacción entre ambas proteínas mediante experimentos de co-inmunoprecipitación. Puesto que no podemos detectar Cdc14A endógena con los anticuerpos disponibles, estudiamos la interacción de Myc-Cdc14A con Wee1 endógena. Para ello, transfectamos células HEK293T con Myc-Cdc14A wt o Myc-Cdc14A(PD), además de con otra fosfatasa de especificidad dual, HA-Cdc25A, como control negativo de la especificidad de la co-inmunoprecipitación con Wee1 en las mismas condiciones. Como se muestra en la figura 11A, al realizar la inmunoprecipitación (IP) de Wee1 endógena, observamos interacción tanto con Myc-Cdc14A como con Myc-Cdc14A(PD). Sin embargo, como es de esperar, no detectamos interacción entre Wee1 y HA-Cdc25A (figura 11B), lo que apoya la especificidad de la interacción con Cdc14A. Del mismo modo, analizamos la interacción de Wee1 con Myc-Cdc14B en idénticas condiciones de sobreexpresión en HEK293T y observamos que también esta isoforma de la fosfatasa es capaz de interactuar con Wee1 endógena, lo que sugiere una vez más que Wee1 podría ser un potencial sustrato de Cdc14B (figura 11C). Nuestros datos demuestran que

las fosfatasa Cdc14 interaccionan con Wee1, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de regulación de la fosforilación de Wee1 mediado por ellas.

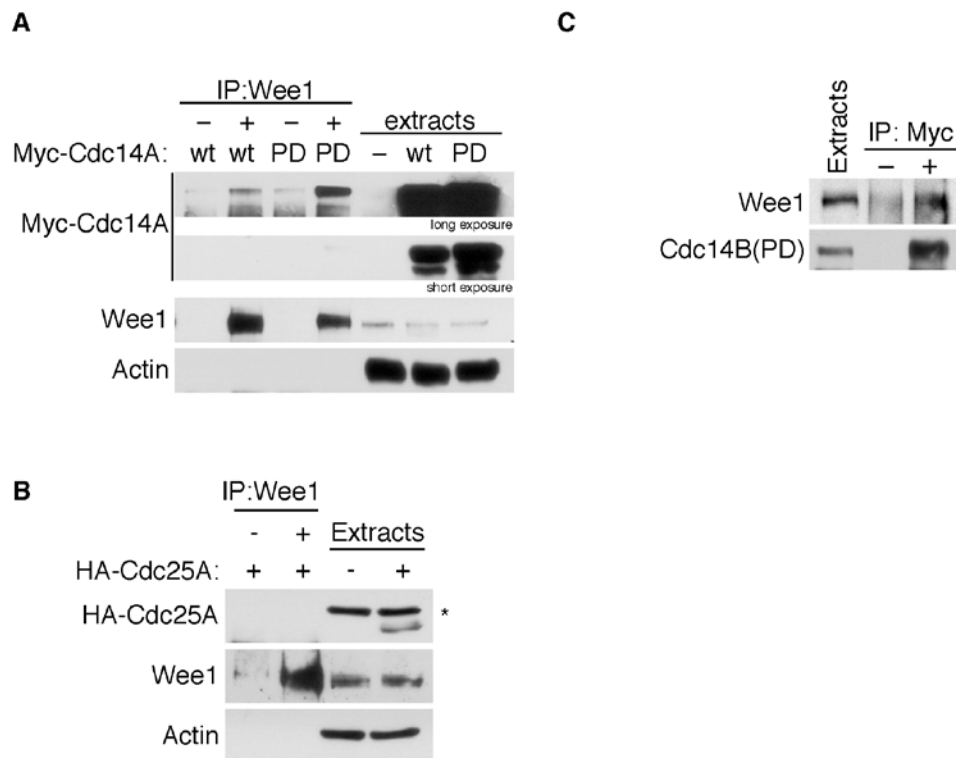


Figura 11. Wee1 interacciona con Cdc14A y Cdc14B. Se transfectaron células HEK293T con Myc-Cdc14A wt, Myc-Cdc14A(PD) (A), HA-Cdc25A (B) o Myc-Cdc14B(PD) (C). Tras 24 horas, se inmunoprecipitó Wee1 endógena, como control negativo (-) se incubaron las muestras en las mismas condiciones pero en ausencia de un anticuerpo específico frente a Wee1. Los inmunoprecipitados se analizaron mediante *western blot* para detectar Wee1 y la presencia o ausencia de Myc-Cdc14A, Myc-Cdc14B o HA-Cdc25A. * indica que la banda es inespecífica.

A continuación, estudiamos con qué región de Wee1 interaccionan las fosfatasa Cdc14. En la secuencia de Wee1 existen dieciséis sitios potenciales de fosforilación por CDKs (figura 12), de los cuales están descritos *in vivo* Ser¹²³ (Watanabe et al., 2005; Watanabe et al., 2004), Thr²³⁹ (Li et al., 2010) y Ser⁴⁷² (Owens et al., 2010).

Resultados

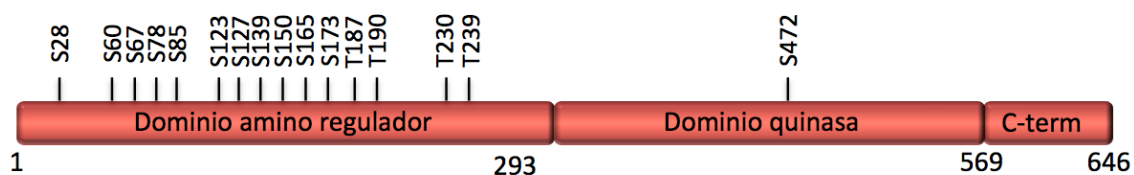


Figura 12. Dominios de Wee1 y sitios potenciales de fosforilación por CDKs. En el esquema se muestran los dominios principales de Wee1. En la parte superior se indican los residuos potencialmente fosforilables por CDKs según su secuencia (S/T-P). “C-term”= dominio carboxilo terminal.

Realizamos dos construcciones truncadas de la proteína HA-Wee1, la ND (N-amino Domain o ND) (aminoácidos 1 a 257), en la cual están presentes 15 sitios potenciales de fosforilación, y la CD (Carboxyl Domain o CD, formada por el dominio quinasa y el dominio carboxilo terminal) (aminoácidos 258 a 646), en la que sólo está presente la Ser⁴⁷² (Owen et al., 2010). Co-transfectamos Myc-Cdc14A y cada una de estas construcciones truncadas de Wee1 o la proteína total (Full Lenght o FL) en células HEK293T y analizamos la interacción entre ambas mediante ensayos de co-inmunoprecipitación. Como se muestra en la figura 13A, HA-Wee1 FL interacciona con Myc-Cdc14A al igual que la proteína endógena. En el caso de la construcción correspondiente al ND de Wee1, también observamos interacción con la fosfatasa, no así en el caso del CD (figura 13B), lo que sugiere que la interacción Wee1-Cdc14A podría estar mediada por la fosforilación de la región ND de Wee1.

Por otra parte, al analizar en las mismas condiciones la interacción de estos dominios con Myc-Cdc14B, observamos que tanto el dominio amino como el carboxilo de Wee1 interaccionan con esta isoforma de la fosfatasa (figura 13C), lo que sugiere que la regulación que podría estar ejerciendo sobre ella sería distinta de la de Cdc14A.

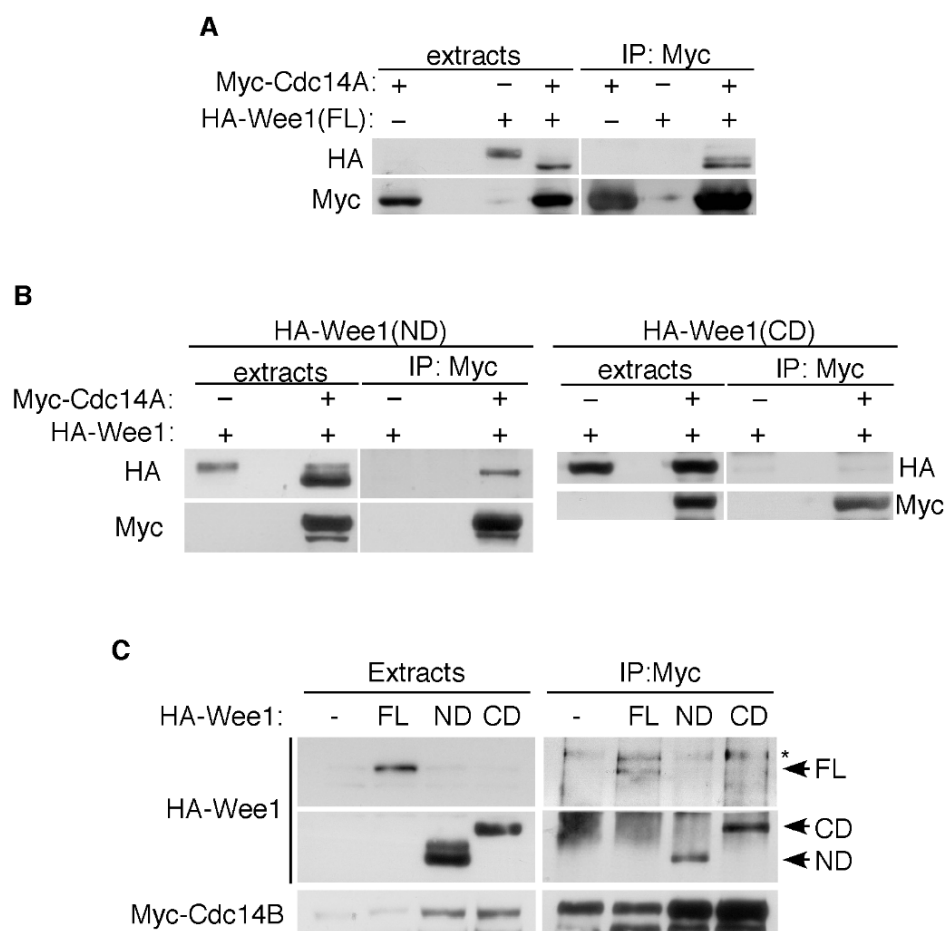


Figura 13. Cdc14A interacciona con el dominio amino de Wee1 y Cdc14B con sus dominios amino y carboxilo. A, B) Se transfirieron células HEK293T con Myc-Cdc14A y HA-Wee1 total (FL), su dominio amino (ND) o carboxilo (CD). Tras 40 horas de transfección, se inmunoprecipitó Cdc14A con un anticuerpo específico frente a Myc y se detectó la presencia de HA-Wee1 con un anticuerpo frente a la etiqueta HA. Como control negativo se utilizaron extractos en los que sólo está presente HA-Wee1(FL), HA-Wee1(ND) o HA-Wee1(CD). **C)** Se transfirieron células HEK293T con Myc-Cdc14B y el vector pCEFL-HA vacío, HA-Wee1(FL), HA-Wee1(ND) o HA-Wee1(CD). Tras 40 horas de transfección se inmunoprecipitó Cdc14B con un anticuerpo frente a Myc y se analizó la presencia de Wee1 como en A y B. * indica que la banda es inespecífica.

Regulación de Wee1 por Cdc14A

Nuestros resultados muestran que Cdc14A interacciona con el dominio regulador de Wee1, en el cual la proteína sufre hiperfosforilación en mitosis. Esto sugiere que Wee1 es un sustrato directo de Cdc14A. Para comprobarlo realizamos ensayos fosfatasa *in vitro* utilizando como sustrato inmunoprecipitados de Wee1 de células U2OS Myc-Cdc14A wt no inducidas (condiciones control T+) y como fosfatasas las proteínas recombinantes GST-Cdc14A o GST-Cdc14A(PD) purificadas de *Escherichia coli*. Como se muestra en la figura 14A, GST-Cdc14A es capaz de desfosforilar a Wee1 en estas

Resultados

condiciones, lo que se demuestra por el cambio en su movilidad electroforética, mientras que la forma inactiva de la fosfatasa no lo hace. Estos datos indican que Cdc14A tiene capacidad de desfosforilar directamente a Wee1.

Puesto que Cdc14A elimina fosforilación debida a CDKs o MAPKs (Bremmer et al., 2012), analizamos si es capaz de revertir la fosforilación de Wee1 mediada por CDKs. Dado que Wee1 es capaz de autofosforilarse (Katayama et al., 2005; Kim et al., 2005), construimos un mutante inactivo GST-Wee1 Lys³²⁸Arg o KD (*Kinase Dead*) para evitar que la autofosforilación interfiriera con los resultados. Fosforilamos este mutante GST-Wee1(KD) *in vitro* con los complejos Cdk1-Ciclina B1 en presencia de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. Después, eliminamos los complejos y el exceso del isótopo radiactivo e incubamos a Wee1 con GST-Cdc14A o GST-Cdc14A(PD) para comprobar si se produce desfosforilación. En la figura 14B se observa que sólo la forma activa de Cdc14A es capaz de eliminar parcialmente la fosforilación de Wee1 debida a los complejos CDK, lo que sugiere que Wee1 sería realmente un sustrato de la fosfatasa y que ésta estaría revirtiendo directamente su fosforilación por CDKs.

Para corroborar que Cdc14A es capaz de eliminar esta fosforilación, co-transfectamos células HEK293T con HA-Wee1 y Myc-Cdc14A wt o Myc-Cdc14A(PD) e inmunoprecipitamos Wee1 con anti-HA, para después analizarla por *western blot* utilizando un anticuerpo específico anti-pSer(CDKs). Como se ve en la figura 14C, la sobreexpresión de Cdc14A no sólo produce un marcado cambio en la movilidad de Wee1 sino que también elimina su fosforilación por CDKs en Serina. En conjunto, todos estos datos indican que Wee1 es un sustrato de Cdc14A, con la cual interacciona para ser desfosforilada en residuos modificados por los complejos CDK.

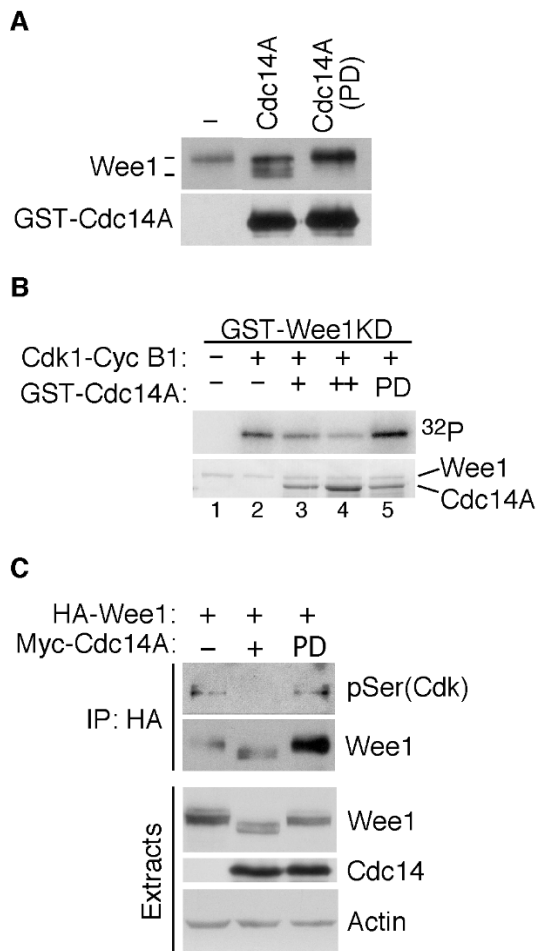


Figura 14. Cdc14A revierte la fosforilación de Wee1 debida a los complejos CDK. A) Se inmunoprecipitó Wee1 procedente de células U2OS-Myc-Cdc14A en condiciones de represión (T+). Los IPs correspondientes a 500µg de extracto total se incubaron en presencia de 100ng de GST-Cdc14A wt o GST-Cdc14A(PD). La desfosforilación de Wee1 se visualiza como un aumento en su movilidad electroforética. **B)** Se fosforiló GST-Wee1(KD) con complejos Cdk1-Ciclina B1 en presencia de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, tras lo cual se lavó abundantemente y se incubó en presencia de GST-Cdc14A wt o GST-Cdc14A(PD). La cantidad total de las proteínas se detectó mediante tinción con Coomassie (panel inferior) y la cantidad de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP mediante autorradiografía (panel superior). El símbolo ++ indica que en esa reacción se utilizó el doble de cantidad de GST-Cdc14A que en los carriles marcados como +. **C)** Células HEK293T se transfectaron con HA-Wee1 y Myc-Cdc14A wt o Myc-Cdc14A(PD). Wee1 se inmunoprecipitó empleando un anticuerpo frente a HA. Los inmunoprecipitados (IP:HA) se detectaron con anti-pSer(CDKs) para comprobar el estado de fosforilación y posteriormente con anti-Wee1 para cuantificar la proteína total.

Cdc14A desfosforila a Wee1 en Ser¹²³ y Ser¹³⁹

Nuestros datos muestran que Cdc14A desfosforila directamente a Wee1 en residuos CDK y regula su estabilidad. Por todo ello decidimos profundizar en el estudio del mecanismo a través del cual esto sucede e identificar los residuos implicados en él. Estudios previos han demostrado que la degradación de Wee1 durante la transición G2/M es controlada, al menos en parte, a través de la fosforilación de Ser¹²³ por los complejos CDK (figura I-4) (Watanabe et al., 2005; Watanabe et al., 2004). Nuestra hipótesis es que este residuo sería el candidato ideal para ser desfosforilado por Cdc14A. Por otra parte, en la secuencia de Wee1 existe otro residuo, Ser¹³⁹, que también presenta la secuencia consenso estricta de fosforilación por CDKs y se encuentra en una región cercana a la Ser¹²³, por lo que la estudiamos en paralelo a la Ser¹²³ como candidata a ser regulada por Cdc14A.

Resultados

Para analizar esta posibilidad, generamos mutantes no fosforilables del dominio amino de Wee1, en los que la Ser¹²³ y la Ser¹³⁹ fueron sustituidas por Alanina (aminoácido no fosforilable), dando lugar a los mutantes simples S123A y S139A, y al mutante doble 2A. Expresamos y purificamos estas proteínas en *E. coli* y las sometimos a fosforilación *in vitro* con los complejos Cdk1-Ciclina B1 en presencia de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP y posterior desfosforilación con GST-Cdc14A o GST-Cdc14A(PD) (figura 15A). Tanto GST-Wee1 wt como los dos mutantes simples (S123A y S139A) son fosforilados por los complejos CDK (carriles 1, 4 y 7) y esta fosforilación es parcialmente revertida por la forma activa de Cdc14A (carriles 2, 5 y 8), pero no por la inactiva (carriles 3, 6 y 9). Sin embargo, en el caso del doble mutante 2A, a pesar de que es fosforilado por los complejos CDK (carril 10), Cdc14A wt no es capaz de desfosforilarlo (carriles 11 y 12), lo cual indica que la fosfatasa sólo podría eliminar la fosforilación mediada por CDKs en las Serinas 123 y 139 de Wee1. Además, éste es el primer indicio de que la Ser¹³⁹ podría ser fosforilada por CDKs.

Para estudiar la desfosforilación de Ser¹²³ y Ser¹³⁹ por Cdc14A, utilizamos dos anticuerpos fosfoespecíficos, pSer123(Wee1) (un anticuerpo comercial) y pSer139-Wee1, generado, purificado y caracterizado por nosotros para este trabajo (ver Materiales y Métodos). Cabe destacar que durante el proceso de caracterización de este anticuerpo pSer139(Wee1), comprobamos que al estar dirigido contra un péptido pequeño que contiene el sitio consenso estricto de fosforilación por CDKs, en extracto total reconoce múltiples sustratos de estas quinasas, lo que se traduce en la aparición de numerosas bandas inespecíficas. Conseguimos evitar este problema utilizando inmunoprecipitados de Wee1.

Inmunoprecipitamos HA-Wee1 de células HEK293T tratadas con nocodazol (NZ) y repartimos estos inmunoprecipitados en varias reacciones: no tratada (NT) y sometida a desfosforilación *in vitro* con Cdc14A wt, Cdc14A(PD) o la fosfatasa lambda (λ PP). Posteriormente analizamos la fosforilación de Ser¹²³ y Ser¹³⁹ con los anticuerpos pSer123(Wee1) y pSer139(Wee1). Como puede verse en las figuras 15B y 15C, Cdc14A wt y λ PP son capaces de desfosforilar ambas Serinas de Wee1. Como control de la especificidad de estos anticuerpos utilizamos los mutantes no fosforilables HA-Wee1 S123A y S139A, de modo que corroboramos que ninguno de los anticuerpos

fosfoespecíficos es capaz de reconocer a Wee1 cuando el residuo correspondiente no está fosforilado. Por lo tanto, estos resultados muestran que Cdc14A es capaz de desfosforilar *in vitro* a Wee1 tanto en Ser¹²³ como en Ser¹³⁹.

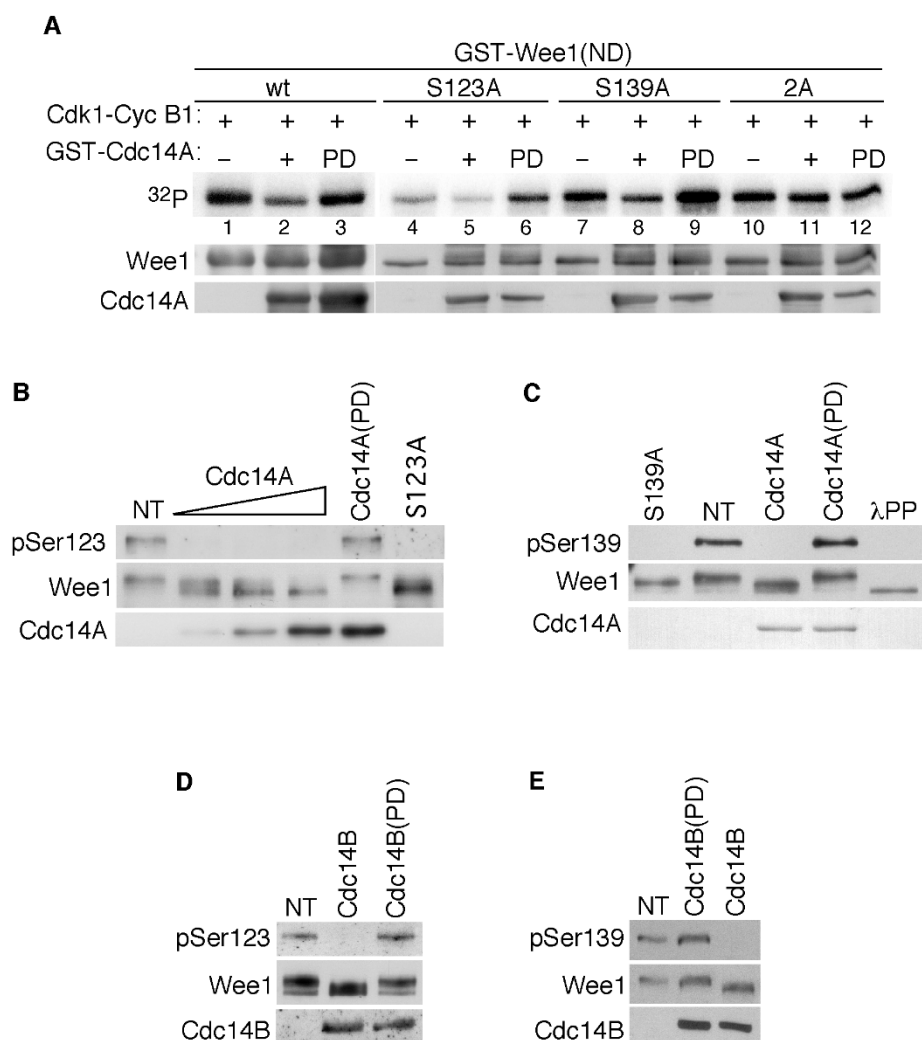


Figura 15. Las Ser¹²³ y Ser¹³⁹ de Wee1 son desfosforiladas por fosfatasas Cdc14. **A)** Las proteínas recombinantes GST-Wee1(ND) wt y sus mutantes simples (S123A, S139A) y doble (2A) se fosforilaron *in vitro* con complejos Cdk1-Ciclina B1 en presencia de γ^{32} P-ATP. Tras la fosforilación se lavaron abundantemente para eliminar los complejos CDK y el exceso del isótopo radiactivo y se procedió a la incubación con GST-Cdc14A wt o GST-Cdc14A(PD). Se detectaron GST-Wee1 y GST-Cdc14A mediante *western blot* con anticuerpos anti-GST y los niveles de γ^{32} P-ATP por autorradiografía. **B, C)** Células HEK293T se transfectaron con HA-Wee1. Tras 12 horas se trataron con nocodazol (12 horas) para acumular células en mitosis. Se inmunoprecipitó Wee1 utilizando anti-HA y los inmunoprecipitados se incubaron con GST-Cdc14A, GST-Cdc14A(PD) o λ PP. NT = no tratadas. La fosforilación en Ser¹²³ y Ser¹³⁹ se detectó mediante anticuerpos fosfo-específicos (pSer123 y pSer139). Posteriormente se analizó la cantidad total de Wee1 en la misma membrana mediante incubación con anti-Wee1. Como control negativo de la especificidad de los anticuerpos fosfoespecíficos se utilizaron mutantes HA-Wee1 S123A y HA-Wee1 S139A, no fosforilables en los correspondientes residuos. **D, E)** Inmunoprecipitados de HA-Wee1 (obtenidos como en B,C) se incubaron con GST-Cdc14B wt o GST-Cdc14B(PD) y posteriormente fueron analizados por *western blot* con los anticuerpos indicados.

Resultados

Según nuestros datos de interacción y sobreexpresión, Cdc14B también es un potencial regulador de Wee1, por lo que decidimos analizar su capacidad para desfosforilar las Serinas 123 y 139 en estas mismas condiciones. Para ello, incubamos HA-Wee1 wt con GST-Cdc14B wt o GST-Cdc14B(PD) mediante el mismo tipo de ensayos descritos anteriormente. Observamos que, al menos en estas condiciones experimentales, Cdc14B también es capaz de desfosforilar ambas Serinas (figuras 15D y 15E).

Los mismos resultados se obtuvieron tras la sobreexpresión de las fosfatasas activas Cdc14 y Cdc14B en células HEK293T (figura 16). A pesar de que Cdc14B tiene capacidad de desfosforilar a Wee1, la falta de efecto sobre los niveles de Wee1 tras la depleción de Cdc14B sugiere que en las células esta fosfatasa no está regulando a Wee1 durante un ciclo celular normal (figura 10), por lo que centramos nuestro trabajo en la caracterización de la desfosforilación de Ser¹²³ y Ser¹³⁹ mediada exclusivamente por Cdc14A.

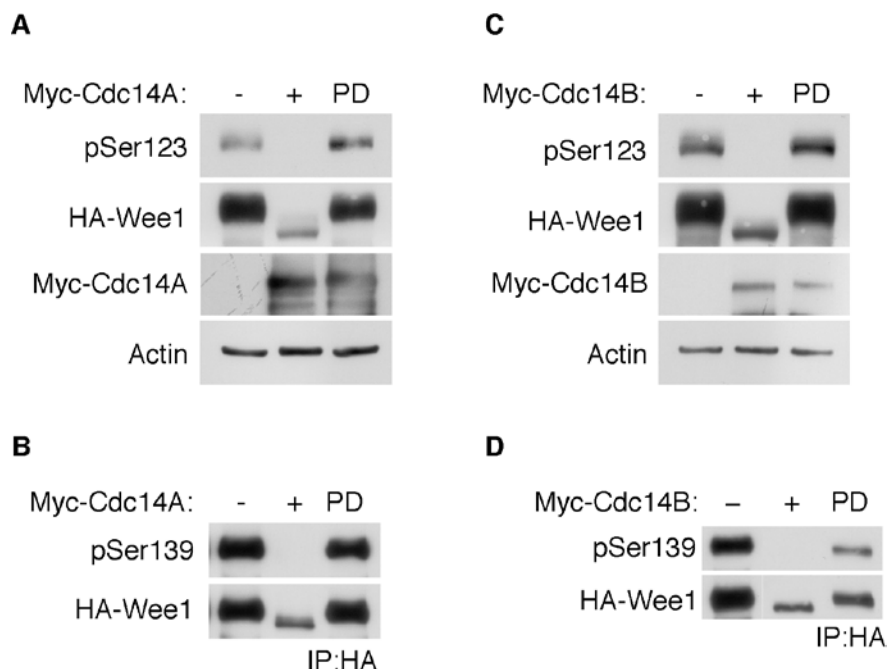


Figura 16. La sobreexpresión de Cdc14A y Cdc14B induce la desfosforilación de Wee1 en Ser¹²³ y Ser¹³⁹. Células HEK293T se transfectaron con HA-Wee1 y Myc-Cdc14A, Myc-Cdc14B o sus formas inactivas y se recogieron tras 48h. **A, C)** Los extractos se analizaron directamente mediante electroforesis para detectar la fosforilación en Ser¹²³ y la cantidad total de Wee1. **B, D)** HA-Wee1 wt se inmoprecipitó con anti-HA y se analizaron los IPs con anti-pSer139 y anti-Wee1.

Para comprobar que la desfosforilación de Ser¹²³ y Ser¹³⁹ depende de Cdc14A, silenciamos la expresión de la fosfatasa en células U2OS mediante transfección con siRNA Cdc14A o siRNA Control. Puesto que la falta de la fosfatasa disminuye los niveles proteicos de Wee1, inhibimos al proteasoma mediante tratamiento con MG132 para impedir la degradación de la proteína y poder analizar los niveles de fosforilación de ambas Serinas en estas condiciones. Como puede verse en la figura 17, la depleción de la fosfatasa promueve la degradación de Wee1 como ya hemos demostrado. Cuando estas células son tratadas con MG132, observamos que Wee1 se estabiliza y que la fosforilación en Ser¹²³ y Ser¹³⁹ es mayor que en condiciones control.

En conjunto, estos resultados indican que Wee1 está fosforilada en Ser¹²³ y Ser¹³⁹ y que su desfosforilación depende directamente de Cdc14A, posiblemente para impedir su degradación.

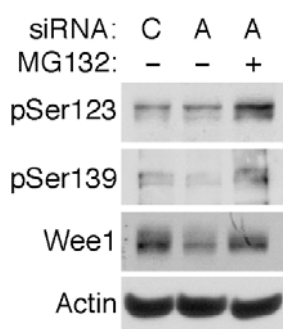


Figura 17. La depleción de Cdc14A aumenta la fosforilación de Wee1 en Ser¹²³ y Ser¹³⁹. Células U2OS se transfectaron con siRNA Control (C) o siRNA Cdc14A (A). Tras 42 horas se añadió MG132 (20µM) o el vehículo DMSO durante 6 horas. Los extractos celulares se analizaron mediante *western blot* con los anticuerpos indicados.

Caracterización de la fosforilación de Wee1 en Ser¹³⁹

Puesto que nuestros resultados muestran que Wee1 es fosforilada en Ser¹³⁹, la cual no había sido descrita anteriormente, y que la fosforilación de este residuo es regulada por Cdc14A, decidimos estudiar su significado funcional. Dado que la hiperfosforilación de Wee1 es un proceso en cascada en el que participan varias quinasas, analizamos en primer lugar cómo afecta la falta de fosforilación en la Ser¹³⁹ al resto de fosforilaciones, así como la falta de fosforilación en la Ser¹²³ o en ambos residuos a la vez. Para ello, mediante infección con retrovirus generamos líneas celulares U2OS estables que expresan bajos niveles de HA-Wee1 wt o sus mutantes simples y

Resultados

doble a Alanina (S123A, S139A y 2A) y comprobamos el estado de fosforilación de Wee1 tanto en interfase como en mitosis.

Como se observa en la figura 18A, la mutación de Ser¹²³ y Ser¹³⁹ a Alanina afecta a la movilidad electroforética de Wee1 en interfase, de modo que todos los mutantes presentan una migración más rápida que la proteína silvestre, lo que indica que su estado de fosforilación es menor. En el caso de las células mitóticas, este cambio en la movilidad es todavía más pronunciado, de manera que el mutante Wee1 S123A no consigue alcanzar el nivel de hiperfosforilación de Wee1 wt característico de mitosis. Además, el mutante Wee1 S139A y el doble mutante Wee1 2A apenas se fosforilan respecto a interfase, lo que sugiere que ambos residuos serían necesarios para desencadenar la hiperfosforilación mitótica de Wee1. El tratamiento de las células con un inhibidor de CDKs como Purvananol A, eliminó por completo la fosforilación de Ser¹³⁹, lo que confirmó que se trata de una fosforilación dependiente de la actividad de los complejos CDK (figura 18B).

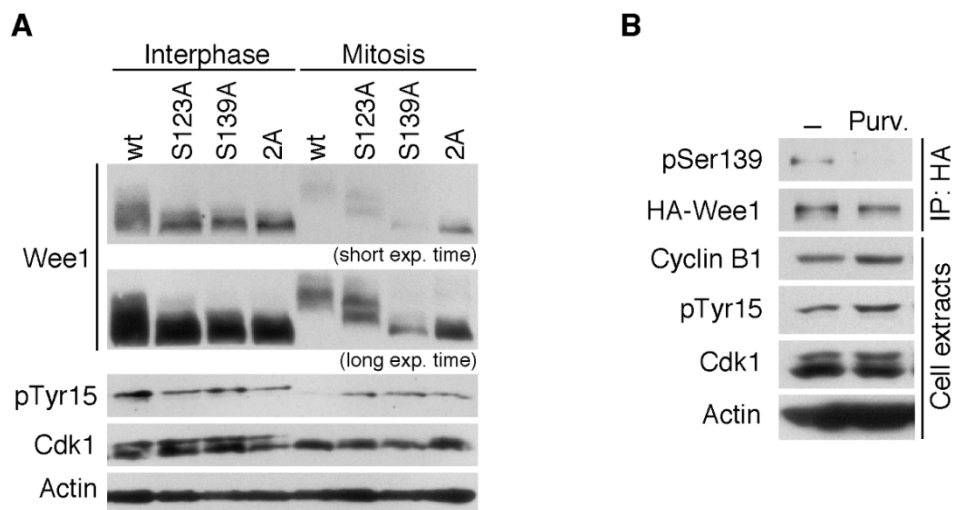


Figura 18. La fosforilación en Ser¹³⁹ afecta al estado general de fosforilación de Wee1. **A)** Líneas estables U2OS-HA-Wee1 wt, S123A, S139A o 2A se trataron con nocodazol (50ng/ml durante 12 horas). Se recogieron de manera independiente las células redondeadas (mitóticas) y las adheridas (interfásicas). Los extractos se analizaron mediante *western blot*. **B)** Se transfectaron células HEK293T con HA-Wee1 wt y se trataron durante 6 horas con el vehículo DMSO (-) o el inhibidor de CDKs Purvalanol A (Purv). Se inmunoprecipitó Wee1 con anti-HA y se detectó la fosforilación de Ser¹³⁹ con un anticuerpo fosfoespecífico. Los extractos totales también fueron analizados para las proteínas indicadas.

Dado que las fosforilaciones que median la degradación de Wee1 a la entrada en mitosis se producen en cascada, y que en el mutante Wee1 S139A el patrón de fosforilación es mínimo, nos planteamos si la fosforilación en este residuo es la iniciadora de dicha cascada. Si éste fuera el caso, un mutante Wee1 S139A no podría estar fosforilado en Ser¹²³. Para analizar esta posibilidad, inmunoprecipitamos HA-Wee1 wt y los mutantes S123A, S139A y 2A, a partir de células HEK293T transfectadas con las distintas construcciones y sincronizadas en mitosis, y analizamos la fosforilación en ambas Serinas (figura 19). Nuestros resultados muestran que el mutante Wee1 S123A se encuentra fosforilado en Ser¹³⁹ y el mutante Wee1 S139A se encuentra fosforilado en Ser¹²³. Por su parte, el doble mutante Wee1 2A, como cabe esperar, no presenta fosforilación en ninguno de estos dos residuos. Estos datos indican que la falta de fosforilación de Ser¹²³ o Ser¹³⁹ no afecta a la fosforilación del otro residuo en mitosis, es decir, su fosforilación por los complejos CDK no se llevaría a cabo de manera secuencial, sino que ambas fosforilaciones pueden producirse de manera independiente.

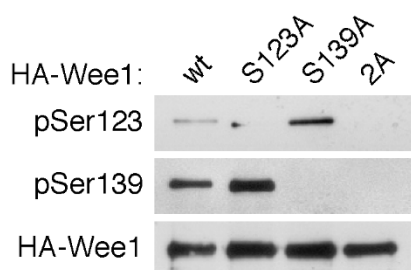


Figura 19. Las fosforilaciones de Wee1 en Ser¹²³ y Ser¹³⁹ son independientes. Células HEK293T se transfectaron con HA-Wee1 wt o sus mutantes a Alanina. Tras 24 horas se añadió nocodazol (12h). Se inmunoprecipitó Wee1 de estas células con anti-HA. La fosforilación en Ser¹²³ y Ser¹³⁹ se analizó mediante anticuerpos específicos. La cantidad total de inmunoprecipitado se detectó mediante anti-Wee1.

Puesto que Wee1 es una proteína cuyo estado de fosforilación sufre grandes oscilaciones a lo largo del ciclo celular, nos planteamos analizar la fosforilación de Wee1 en la Ser¹³⁹ durante las distintas fases del ciclo. Para caracterizar dicha fosforilación, sincronizamos una línea celular U2OS que expresa de manera estable HA-Wee1 wt en distintos puntos del ciclo celular mediante tratamiento con diversas drogas (figura 20A). El perfil del ciclo celular fue analizado por citometría de flujo (figura 20B, derecha) y mediante *western blot* con marcadores específicos (figura 20B, izquierda). Inmunoprecipitamos HA-Wee1 en cada uno de estos puntos del ciclo y analizamos su fosforilación con anti-pSer139-Wee1. Como puede observarse en la figura 20B, la

Resultados

fosforilación en Ser¹³⁹ está presente durante interfase, es máxima durante mitosis, desaparece en G1 y vuelve a aparecer a bajos niveles ya en G1/S. Estos datos indican que la fosforilación de este residuo oscila a lo largo del ciclo celular, siendo mayor cuando la actividad de los complejos CDK mitóticos es mayor y desapareciendo a la salida de mitosis, cuando los complejos son inhibidos.

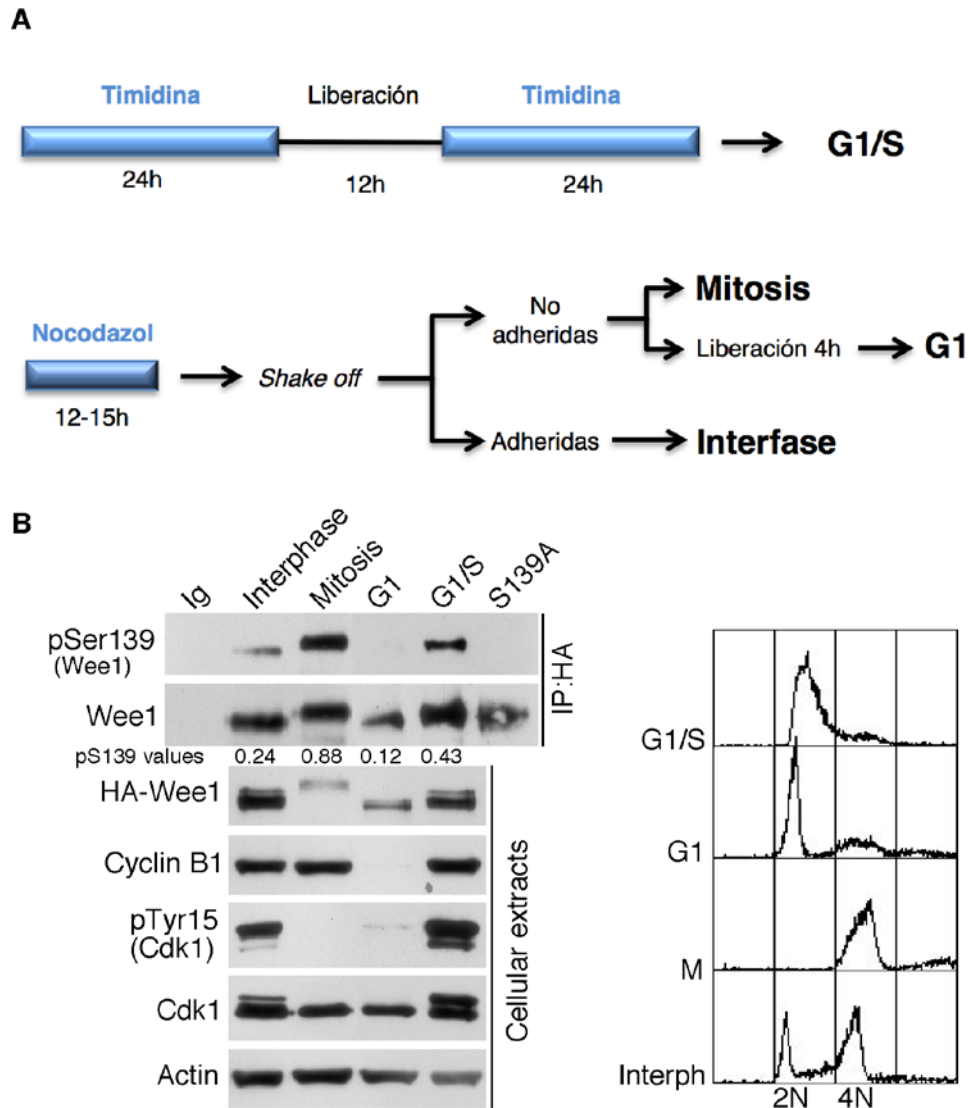


Figura 20. Fosforilación de Wee1 en Ser¹³⁹ a lo largo del ciclo celular. A) El esquema muestra los tratamientos llevados a cabo en células U2OS para su sincronización en las distintas fases del ciclo celular. B) Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo (derecha). Se inmunoprecipitó Wee1 de los extractos utilizando anti-HA y los IPs se analizaron con anti-pSer139-Wee1 y anti-Wee1 total. La cuantificación de la fosforilación en Ser¹³⁹ respecto a la cantidad total de Wee1 en cada caso se muestra debajo del panel correspondiente. Ig indica el control negativo de inmunoprecipitación, en el que se ha llevado a cabo el mismo procedimiento que en el resto de muestras pero en ausencia de anticuerpo. S139A indica que se inmunoprecipitó el mutante Wee1 S139A como control de la especificidad del anticuerpo pSer139(Wee1). Los extractos celulares fueron analizados mediante *western blot* para las proteínas indicadas.

Con el objeto de conocer el significado funcional de la fosforilación de Wee1 en Ser¹³⁹, en primer lugar analizamos la actividad quinasa del mutante Wee1 S139A en paralelo con la proteína wt y el mutante Wee1 S123A. Para ello, transfectamos células HEK293T con los diferentes plásmidos de expresión y analizamos mediante *western blot* el estado de fosforilación de su sustrato mejor caracterizado, la Tyr¹⁵ de Cdk1. Como control, utilizamos células transfectadas con el vector HA-vacío o con el mutante inactivo HA-Wee1(KD). Como puede observarse en la figura 21, en ambos controles existe una fosforilación basal de Tyr¹⁵(Cdk1), que se ve muy aumentada a niveles comparables cuando sobreexpresamos HA-Wee1 wt o cualquiera de los mutantes a Alanina. Estos datos indican que la fosforilación de Wee1 en Ser¹²³ o Ser¹³⁹ no afecta a su actividad quinasa.

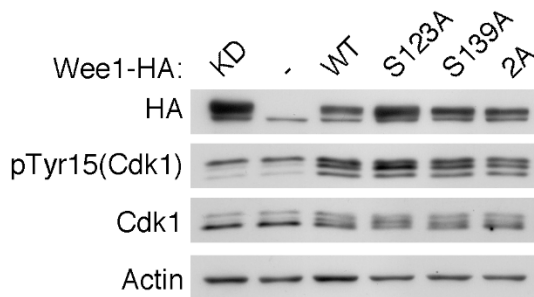


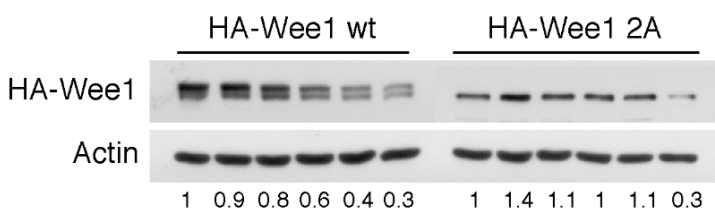
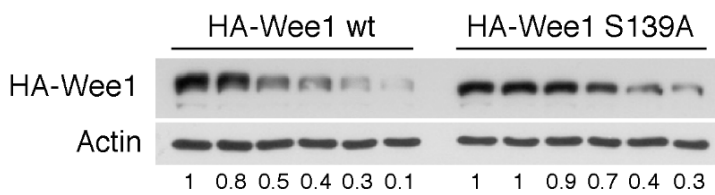
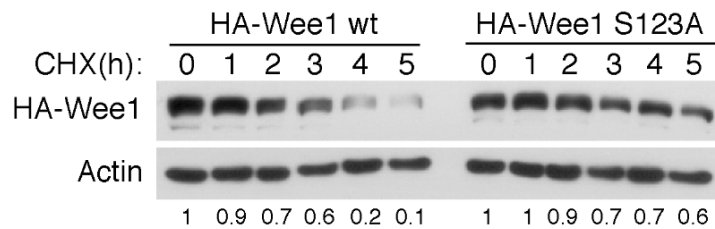
Figura 21. El estado de fosforilación de Wee1 en Ser¹²³ y Ser¹³⁹ no afecta a su actividad catalítica. Células HEK293T se transfectaron con HA-vacío (control negativo), HA-Wee1 wt o los mutantes correspondientes. Tras 48 horas se recogieron y lisaron las células, y los extractos proteicos se analizaron con los anticuerpos indicados.

Dado que la hiperfosforilación de Wee1 en mitosis correlaciona con un aumento en su degradación, es muy posible que la fosforilación en Ser¹³⁹ esté implicada en este proceso. Para probar esta hipótesis, analizamos la estabilidad del mutante Wee1 S139A comparada con la de Wee1 wt. Para ello, transfectamos células HEK2923T con una u otra construcción y las tratamos con cicloheximida para inhibir la síntesis de nuevas proteínas (figura 22A). En paralelo, analizamos la estabilidad del mutante Wee1 S123A, el cual ya ha sido descrito como más estable que Wee1 wt (Watanabe et al., 2005), y el mutante Wee1 2A para detectar un posible efecto sinérgico de ambas Serinas. Para facilitar la interpretación de los resultados, debajo de cada muestra se da la cuantificación de la proteína respecto al tiempo 0 (considerado como valor 1) y normalizada con respecto a la actina. En nuestras manos, tanto el mutante Wee1 S123A

Resultados

como el S139A son más estables que Wee1 wt, como se observa claramente en la cuantificación. Además, el doble mutante Wee1 2A apenas se degrada durante las primeras horas en presencia de cicloheximida, confirmando que el efecto de ambas Serinas sobre la estabilidad de Wee1 es sumatorio. Por otra parte, puesto que el mutante no fosforilable Wee1 S139A es más estable, cabe suponer que un mutante fosfomimético, en el cual la Ser¹³⁹ ha sido sustituida por Aspártico (D) (aminoácido que por la estructura de su cadena lateral mimetiza una fosforilación constitutiva) sería más inestable que Wee1 wt. Como se observa en la figura 22B, efectivamente el mutante Wee1 S139D es más inestable, lo que confirma nuestros datos de que la fosforilación en la Ser¹³⁹ es un mecanismo de control de la degradación de Wee1.

A



B

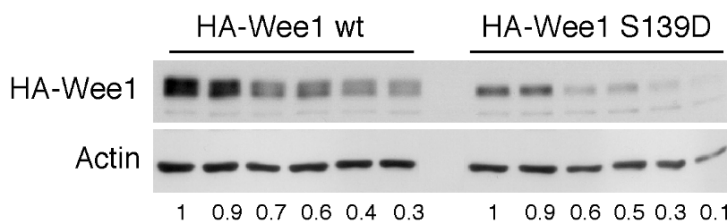


Figura 22. Las Serinas 123 y 139 regulan la estabilidad de Wee1.

A, B) Células HEK293T se transfectaron con HA-Wee1 wt o los mutantes indicados. Tras 24 horas de transfección, se añadió al medio de cultivo cicloheximida (CHX) a una concentración de 25µg/ml durante las horas indicadas. La cantidad de HA-Wee1 presente en estas células tras el tratamiento se analizó mediante *western blot*. Como control de carga se utilizó la actina. La cuantificación mostrada se realizó con el programa *Quantity One*, normalizando la cantidad de Wee1 respecto a la actina en cada tiempo y considerando como valor 1 la cantidad a tiempo 0 de cada construcción.

Comprobamos además la cinética de degradación de cada uno de estos mutantes a la entrada en mitosis. Para ello, generamos cuatro líneas estables de U2OS que expresan HA-Wee1(KD) o sus mutantes a Alanina (S123A(KD), S139A(KD) y 2A(KD)). En este caso utilizamos los mutantes inactivos (KD) para evitar que, aunque a bajos niveles, la sobreexpresión de la proteína tenga un efecto de retraso o freno de la entrada en mitosis y altere los resultados. Sincronizamos los cultivos en G1/S mediante un doble bloqueo con timidina y posteriormente los liberamos en presencia de nocodazol para permitir su progresión por ciclo y su acumulación a medida que llegan a mitosis, tomando muestras a diferentes tiempos. El análisis del perfil de ciclo mediante citometría de flujo nos indica que todas las líneas celulares progresan por fase S y G2/M con la misma velocidad (figura 23A). En el caso de HA-Wee1(KD) observamos que la proteína se encuentra desfosforilada en G1/S (t=0h), aumenta su nivel de fosforilación y se acumula a medida que las células progresan por G2 (t=2h-10h), y se degrada cuando comienzan a acumularse en mitosis (t=12h-14h) (figura 23B). En el caso del mutante HA-Wee1 S123A, el nivel de fosforilación es menor ya en G1/S, posteriormente se acumula con una cinética similar a la de la proteína wt aunque no alcanza el nivel de fosforilación de ésta y su degradación en mitosis es considerablemente menor que la de HA-Wee1 wt, lo que confirma que la fosforilación en este residuo contribuye a la degradación de Wee1 durante la transición G2/M. Por otra parte, el mutante HA-Wee1 S139A presenta niveles constantes desde G1/S hasta la entrada en mitosis, siendo su fosforilación apenas perceptible hasta los tiempos finales. Esto sugiere que la fosforilación en Ser¹³⁹ podría estar contribuyendo a la degradación de Wee1, no sólo en mitosis como Ser¹²³, sino también en la degradación basal de la proteína durante interfase. Finalmente, el mutante HA-Wee1 2A se acumula a lo largo de G2 con una cinética muy similar a la de HA-Wee1 wt y S123A, aunque siempre con menores niveles de fosforilación. A la entrada en mitosis (t=12h-14 h), el mutante HA-Wee1 2A es marcadamente más estable que los mutantes simples, lo que sugiere de nuevo que tanto Ser¹²³ como Ser¹³⁹ tendrían efectos sumatorios en el control de la estabilidad de Wee1 en la transición G2/M.

Resultados

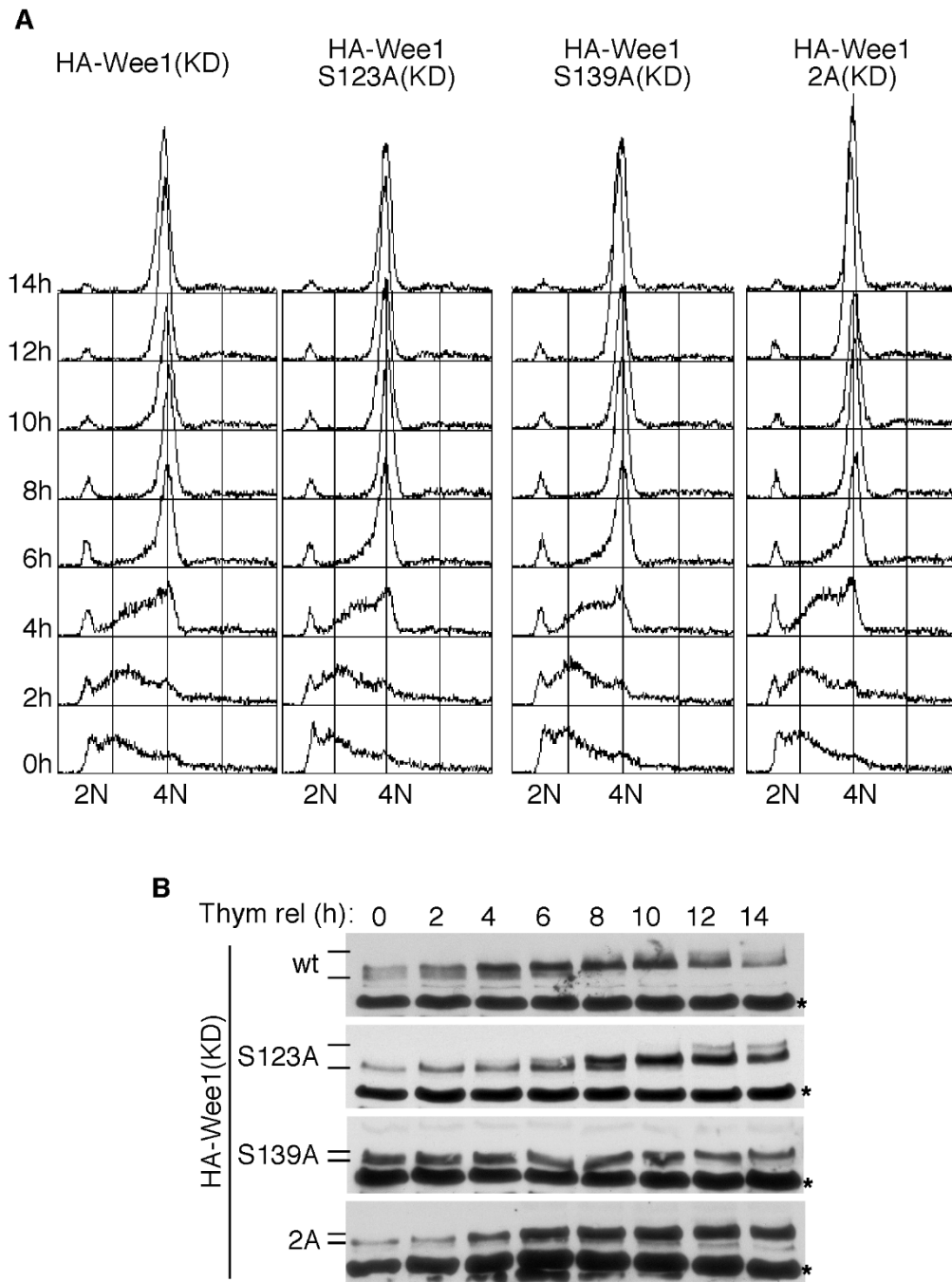


Figura 23. Las fosforilaciones en Ser¹²³ y Ser¹³⁹ regulan la degradación de Wee1 durante la transición G2/M. **A, B)** Células U2OS con expresión estable de HA-Wee1(KD) o sus mutantes a Alanina fueron sincronizadas en G1/S mediante un doble bloqueo con timidina. En el momento de la liberación del segundo bloqueo, se añadió nocodazol al medio. Se tomaron muestras desde tiempo 0h hasta 14h con intervalos de 2 horas. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo y *western blot*. * indica que la banda es inespecífica.

Cdc14A regula la estabilidad de Wee1 a través de la desfosforilación de Ser¹²³ y Ser¹³⁹

Con el fin de corroborar que el mecanismo mediante el cual la fosfatasa Cdc14A está afectando a la estabilidad de Wee1 es la desfosforilación de Ser¹²³ y Ser¹³⁹, analizamos el efecto del silenciamiento de Cdc14A sobre el mutante Wee1 2A, cuya degradación no puede estar regulada por fosforilación en esos dos residuos. Para ello, transfectamos líneas U2OS que expresan de forma estable bajos niveles de HA-Wee1 wt o HA-Wee1 2A con siRNA control o siRNA Cdc14A y analizamos los niveles de Wee1 mediante *western blot* a 48 y 72h post-transfección. Como se muestra en la figura 24, la falta de Cdc14A reduce drásticamente la cantidad de HA-Wee1 wt pero no afecta la del mutante HA-Wee1 2A, lo que demuestra que Cdc14A está impidiendo la degradación de Wee1 manteniendo Ser¹²³ y Ser¹³⁹ desfosforiladas. Nótese como control adicional que la degradación de HA-Wee1 wt a las 72h correlaciona con una disminución de la fosforilación de su sustrato, la Tyr¹⁵ de Cdk1, mientras que los niveles estables del mutante HA-Wee1 2A conllevan siempre el mismo estado de fosforilación de Cdk1.

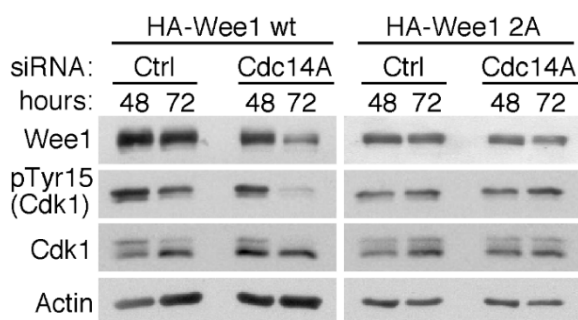


Figura 24. Wee1 no fosforilable en Ser¹²³ y Ser¹³⁹ es estable en condiciones de depleción de Cdc14A. Líneas estables U2OS-HA-Wee1 wt o HA-Wee1 2A se transfectaron con siRNA Control o siRNA Cdc14A. Se tomaron muestras a las 48 y 72h post-transfección y se analizaron mediante *western blot* las proteínas indicadas.

La fosforilación en Ser¹²³ y Ser¹³⁹ regula la interacción de Wee1 con Plk1

En la transición G2/M, la degradación de Wee1 es dependiente de fosforilación por Cdk1 y Plk1. Watanabe y colaboradores demostraron que la fosforilación en Ser¹²³ es crucial para que Plk1 se una y fosfore a Wee1 para promover su degradación. Del mismo modo, nosotros nos preguntamos si la Ser¹³⁹ estaría implicada en la interacción de Plk1 con Wee1 junto con Ser¹²³. Para analizar esta posibilidad, transfectamos células

Resultados

HEK293T con HA-Wee1 wt o los mutantes a Alanina y analizamos la interacción de cada uno de ellos con Plk1 mediante co-inmunoprecipitación. Como se observa en la figura 25, HA-Wee1 wt interacciona claramente con Plk1, mientras que el mutante HA-Wee1 S123A presenta una interacción muy reducida con dicha proteína como ya había sido descrita (Watanabe et al., 2004). Igualmente, el mutante HA-Wee1 S139A presenta menor interacción con Plk1 que la proteína wt. La interacción con el doble mutante HA-Wee1 2A se da a niveles prácticamente indetectables. Por lo tanto, las fosforilaciones en Ser¹²³ y Ser¹³⁹ son cruciales para que Plk1 pueda reconocer, unirse y fosforilar a Wee1 para promover su degradación.

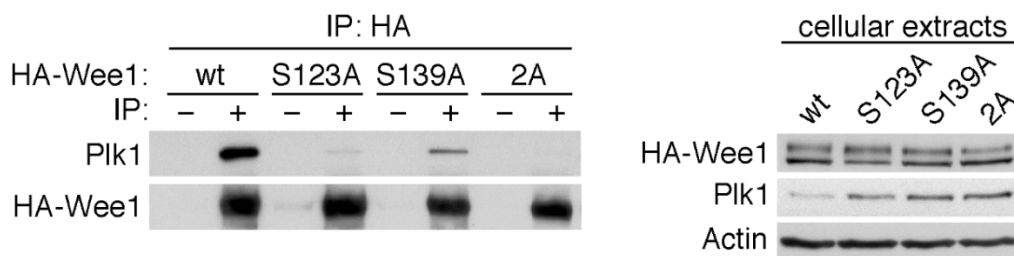


Figura 25. Las fosforilaciones de Wee1 en Ser¹²³ y Ser¹³⁹ regulan su interacción con Plk1. Células HEK293T se transfectaron con HA-Wee1 wt o los mutantes indicados. Las células se lisaron tras 48h y se inmunoprecipitó Wee1 de estos extractos empleando un anti-HA. La presencia y cantidad de Plk1 y Wee1 en estos inmunoprecipitados y en extractos totales se analizaron mediante *western blot*.

Cdc14A no desfosforila a Wee1 durante la salida de mitosis

La hiperfosforilación de Wee1 conlleva una disminución drástica de sus niveles durante mitosis, los cuales comienzan a aumentar al tiempo que la proteína se desfosforila a la salida de mitosis.

Para estudiar si Cdc14A tiene un papel en la desfosforilación de Wee1 a la salida de mitosis en células humanas, silenciamos su expresión en células U2OS mediante transfección con siRNAs específicos. Sincronizamos las células en mitosis mediante tratamiento con nocodazol y las liberamos en medio fresco para permitir su progresión por mitosis y entrada en G1. Como se observa en la figura 26, la falta de Cdc14A no

parece afectar significativamente la salida de mitosis. En cuanto a Wee1, se ve cómo la falta de Cdc14A no impide su desfosforilación en este punto del ciclo.

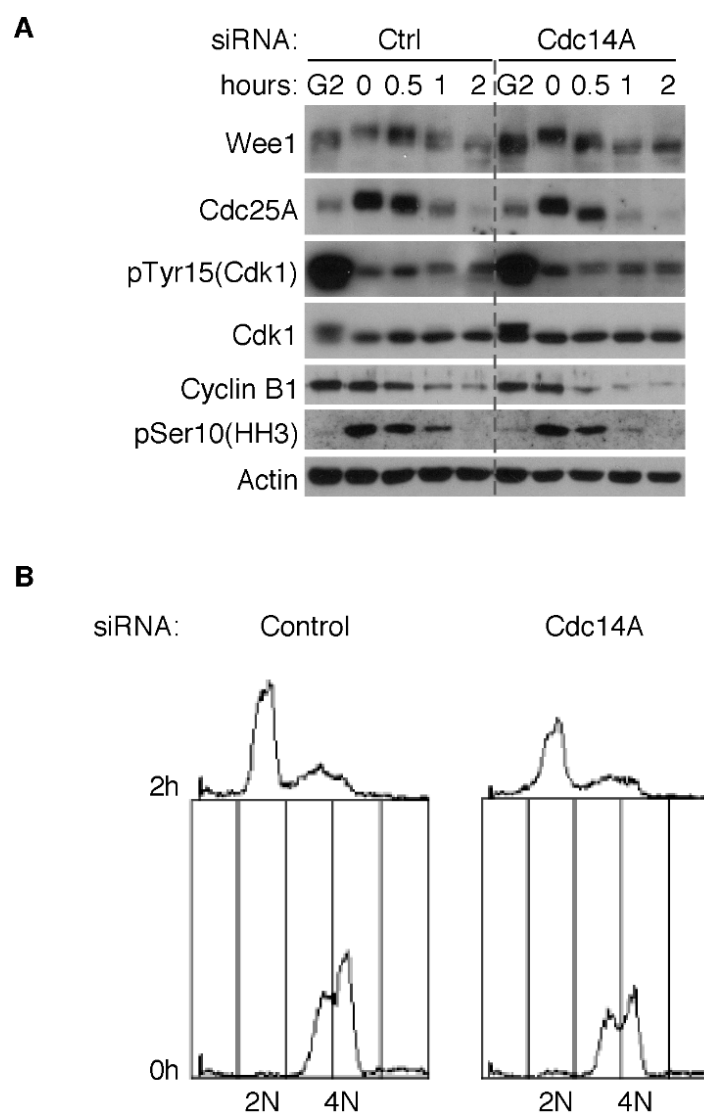


Figura 26. La falta de Cdc14A no impide la desfosforilación de Wee1 durante la salida de mitosis. A, B) Se sincronizaron células U2OS mediante un doble bloqueo con timidina. Entre ambos bloqueos, se transfectaron siRNA Control o siRNA Cdc14A durante 12 horas. Tras la liberación del segundo bloqueo, se añadió nocodazol durante 12 horas para acumular células en mitosis. Se recogieron las células mitóticas por *shake off* y se liberaron en medio fresco para permitir su salida de mitosis. Se tomaron muestras a los tiempos indicados y se analizaron mediante *western blot* y citometría de flujo.

Se ha descrito que la fosfatasa Fcp1 es responsable en parte de la desfosforilación de Wee1 en la transición de mitosis a G1, en concreto en su residuo Thr²³⁹ (Visconti et al., 2012). Sin embargo, los datos disponibles sugieren que existe alguna otra fosfatasa capaz de desfosforilar otros residuos de Wee1 además de la Thr²³⁹ regulada por Fcp1, si bien Cdc14A no parece participar en este proceso.

Resultados

En conjunto, nuestros datos demuestran que Cdc14A interacciona con la quinasa Wee1 durante la transición de G2 a mitosis para desfosforilarla en Ser¹²³ y Ser¹³⁹, haciéndola más estable. Por lo tanto, Cdc14A contribuye a mantener inactivos los complejos CDK durante las fases previas a mitosis, impidiendo su activación prematura afectando a las dos ramas del mecanismo de autoactivación de los complejos: estabilizando a su inhibidor Wee1 e inhibiendo a sus activadores, las fosfatasas Cdc25A y Cdc25B.

REGULACIÓN DE Cdc14A EN CÉLULAS HUMANAS

En el caso de levaduras se conocen con bastante precisión algunos de los mecanismos que regulan a Cdc14. En *S. cerevisiae* la actividad de Cdc14 está mayoritariamente regulada a nivel de su localización subcelular. En *S. pombe*, existe además un control de su actividad catalítica por fosforilaciones inhibitoras por parte de Cdk1, las cuales son revertidas por autodesfosforilación en las últimas fases de mitosis (Wolfe et al., 2006). De esta forma Cdc14 regula su acción sobre los distintos sustratos mitóticos. En el caso de células humanas, se sabe poco sobre su regulación. Se considera que el principal sistema de control es el cambio en su localización subcelular, que restringe o permite el acceso a sus sustratos según el compartimento en el que se encuentren. Así, a la entrada en mitosis Cdc14A y Cdc14B salen de los centrosomas y nucleolos respectivamente y difunden por toda la célula (Kaiser et al., 2002; Mailand et al., 2002a). En el caso de Cdc14A, también se ha descrito que la fosforilación por Plk1 durante mitosis la activa para participar en diversos procesos mitóticos (Yuan et al., 2007).

Conocer con precisión sus mecanismos de regulación es un aspecto importante para entender sus funciones celulares. Así, el estudio de la regulación de Cdc14A constituye el segundo objetivo de nuestro trabajo.

Cdc14A se encuentra fosforilada en células humanas

Datos previos de nuestro grupo sugerían que Cdc14A era una fosfoproteína. El grupo del Dr. P.K. Jackson también había apuntado esta posibilidad al observar dos formas de movilidad diferente de la proteína cuando ésta se resolvía en geles SDS-PAGE de gradiente (Kaiser et al., 2002). Decidimos pues estudiar la posible regulación de Cdc14A por fosforilación.

Según nuestras observaciones, cuando expresamos las formas activa e inactiva de Cdc14A en células humanas vemos que su movilidad es diferente, estando Cdc14A(PD) más retardada respecto a Cdc14A wt (figura 27A). Dado que Cdc14 es una fosfatasa, estos datos sugieren que existe una autodesfosforilación, no presente en la forma inactiva, y que por lo tanto Cdc14A es fosforilada en la célula.

Resultados

Para confirmar esta posibilidad, analizamos los mismos extractos proteicos mediante geles de PhosTag™. El PhosTag™ es un compuesto que se une y retrasa la migración de las proteínas de manera dependiente de la cantidad de fosfatos, permitiéndonos separar sus distintos estados de fosforilación (ver Materiales y Métodos). Además, para corroborar que este cambio en la movilidad electroforética se debe a fosforilación, incubamos los extractos con fosfatasa lambda y analizamos el patrón de bandas. Comprobamos que efectivamente Cdc14A es una fosfoproteína y que la forma activa Flag-Cdc14A wt presenta un nivel de fosforilación menor que Flag-Cdc14A(PD) (figura 27B, carriles centrales), lo que de nuevo sugiere su capacidad de autodesfosforilación. Además, tanto Cdc14A wt como Cdc14A(PD) son desfosforiladas por el tratamiento con λ PP (figura 27B, carriles externos), lo que indica que ambas formas obtenidas a partir de cultivos asincrónicos están fosforiladas.

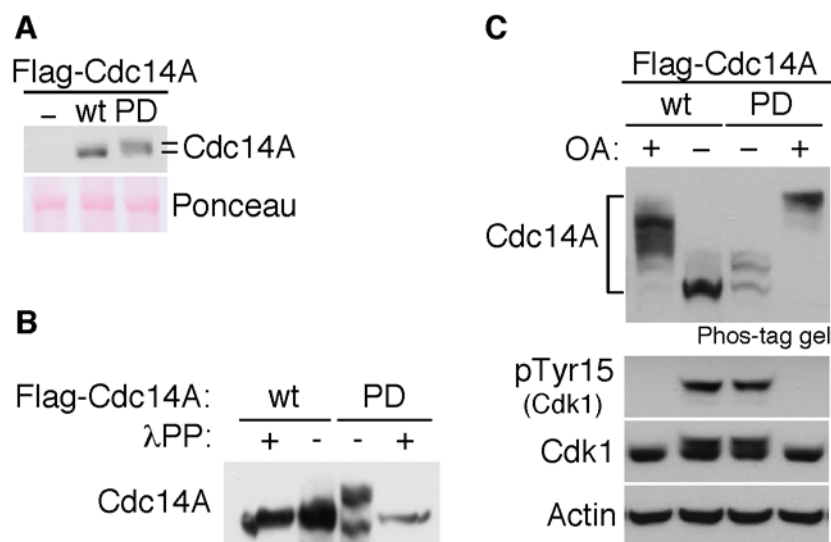


Figura 27. Cdc14A es una fosfoproteína. A) Células HEK293T se transfectaron con Flag-Cdc14A wt o Flag-Cdc14A(PD). Se recogieron tras 24h y se analizaron mediante *western blot*. La tinción de la membrana con *Ponceau* se utilizó como control de carga. **B)** 20 μ g de extractos procedentes del mismo experimento que (A) se trataron o no con λ PP y se analizaron en geles de PhosTag™. **C)** Células HEK293T se transfectaron con Flag-Cdc14A wt o Flag-Cdc14A(PD). Tras 24h de transfección, se trataron con OA o el vehículo DMSO durante 2h. Los extractos se analizaron mediante geles PhosTag™ para Cdc14A y geles estándar SDS-PAGE para las demás proteínas indicadas.

Posteriormente, analizamos qué sucede en una situación de inhibición de las fosfatasa PP2A-like con ácido okadaico (OA), lo que genera una alta actividad quinasa en las células. Si Cdc14A es regulada por fosforilación, esta aproximación nos permitiría ver un incremento de la misma. El tratamiento con OA produce una marcada hiperfosforilación de las formas activa e inactiva de Cdc14A, siendo ésta mayor en el caso de la forma inactiva (figura 27C). Este resultado indica que Cdc14A es una fosfoproteína cuya fosforilación es revertida por fosfatasa sensibles a OA. Además, en estas condiciones también observamos que Cdc14A tiene capacidad de autodesfosforilación, ya que la forma activa migra más rápido que la inactiva tanto en presencia como en ausencia de OA. Todos estos datos indican que Cdc14A está regulada por fosforilación y que este proceso es revertido, al menos en parte, por autodesfosforilación.

Cdc14A es fosforilada en mitosis por los complejos CDK

A continuación, analizamos si la fosforilación de Cdc14A es dependiente de la fase del ciclo celular. Dado que no es posible detectar la proteína Cdc14A endógena con los anticuerpos disponibles, mediante infección con retrovirus originamos clones estables de U2OS que expresan de manera constitutiva HA-Cdc14A wt o HA-Cdc14A(PD) a muy bajos niveles. En ellos se comprobó que la localización de Cdc14A es correcta y que la proliferación de estas células no está significativamente afectada.

Mediante experimentos de sincronización de estos clones, a partir de bloqueos en G1/S o mitosis y posterior liberación, observamos que en interfase existe un estado basal de fosforilación, que aumenta drásticamente cuando las células entran en mitosis. Posteriormente, Cdc14A es desfosforilada durante la salida de mitosis para mostrar en G1 un estado de hipofosforilación (figura 28A). Este patrón de fosforilación se observa también en Cdc14A(PD), si bien la forma inactiva de la proteína presenta a lo largo de todo el ciclo un mayor nivel de fosforilación que la forma activa. Estos análisis muestran que Cdc14A experimenta hiperfosforilación durante la entrada en mitosis y desfosforilación a la salida de ésta.

Resultados

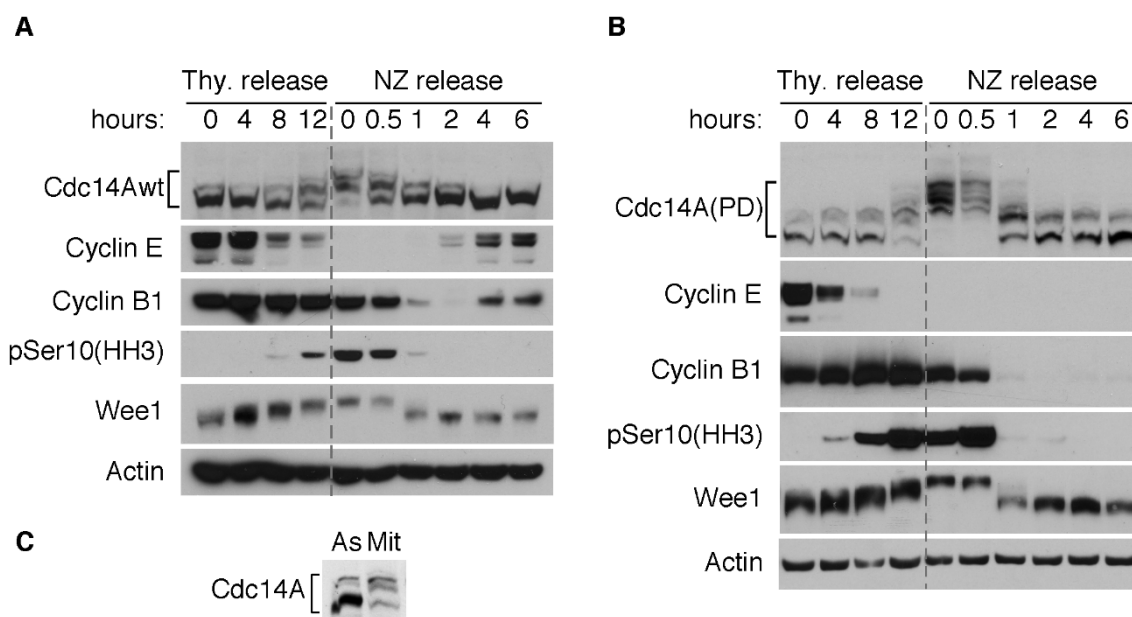


Figura 28. Fosforilación de Cdc14A a lo largo del ciclo celular. **A, B)** Clones de U2OS HA-Cdc14A wt y HA-Cdc14A(PD) se sincronizaron mediante un doble bloqueo con timidina y posterior liberación en presencia de nocodazol. Se recogieron muestras a 0, 4, 8 y 12h de liberación (Thy. release). Por otra parte, tras 12h de tratamiento con nocodazol, se recogieron las células mitóticas mediante *shake off*, se liberaron en medio fresco para permitir su salida de mitosis y se recogieron a los tiempos indicados (NZ release). La movilidad de Cdc14A se analizó en geles de PhosTag™ y la de las demás proteínas en geles normales de SDS-PAGE. **C)** Células U2OS HA-Cdc14A wt se sincronizaron mediante un doble bloqueo con timidina. Tras 10h de liberación del segundo bloqueo, se recogieron las células mitóticas por *shake off* y se analizó la movilidad de Cdc14A en gel de PhosTag™.

Por otra parte, no podemos descartar que la hiperfosforilación de Cdc14A que vemos en mitosis se deba a la activación del SAC que produce el tratamiento con nocodazol. Para eliminar esta posibilidad, sincronizamos las células U2OS HA-Cdc14A en G1/S mediante un doble bloqueo con timidina y las liberamos en medio fresco durante 10 horas. Al observarlas al microscopio, comprobamos que una parte significativa del cultivo se encuentra en alguna fase de mitosis dada la morfología redondeada y refringente de las células mitóticas. Comprobamos que en estas células mitóticas predominan las formas fosforiladas de la proteína, lo que indica que la hiperfosforilación de Cdc14A en mitosis es independiente del tratamiento con nocodazol (figura 28C).

Puesto que el aumento de la fosforilación de Cdc14A se produce en la transición G2/M y la actividad quinasa fundamental en este punto del ciclo es debida a los complejos CDK, analizamos si ellos son los responsables de esta modificación. Para ello, tratamos las células mitóticas con inhibidores de CDKs (Purvalanol A y RO-3306) y

comprobamos que la inhibición de los complejos CDK conlleva la desfosforilación casi total de Cdc14A aún en presencia de nocodazol. Estos datos indican que la fosforilación de Cdc14A en mitosis depende de la actividad CDK (figura 29A).

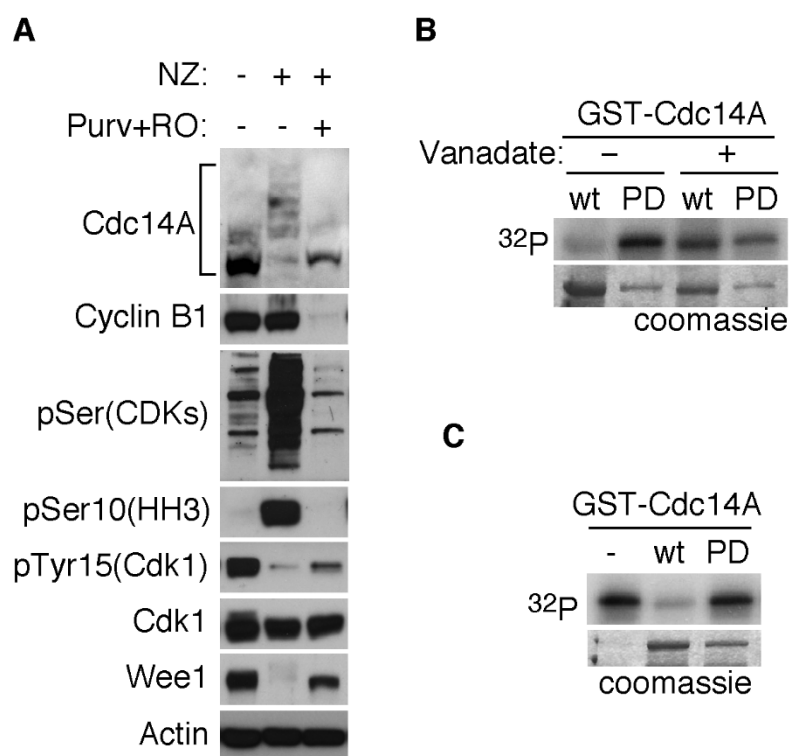


Figura 29. La fosforilación de Cdc14A en mitosis es dependiente de CDKs. **A)** Se recogieron células U2OS HA-Cdc14A(PD) creciendo de manera asíncrona o en mitosis tras un tratamiento con nocodazol (12h). Las células mitóticas se mantuvieron en medio con nocodazol y se trataron o no con los inhibidores de CDK Purvalanol A (Purv) y RO-3306 (RO) durante 3,5 horas. Tras el tratamiento se procesaron estas células y se analizaron mediante *western blot* con los anticuerpos indicados. **B)** GST-Cdc14A o GST-Cdc14A(PD) se incubaron con Cdk1-Ciclina B1 y γ^{32} P-ATP en presencia o ausencia de Vanadato (1mM). Las proteínas recombinantes se detectaron por Coomassie y la incorporación del isótopo mediante autorradiografía. **C)** GST-Cdc14A(PD) se incubó con Cdk1-Ciclina B1 en presencia de γ^{32} P-ATP, se lavó abundantemente para eliminar la quinasa y el exceso de isótopo, y se incubó con 100ng de GST-Cdc14A wt o GST-Cdc14A(PD) en buffer fosfatasa. Las proteínas recombinantes se detectaron por Coomassie y la incorporación del isótopo mediante autorradiografía.

Posteriormente, con el objeto de comprobar que efectivamente Cdc14A es sustrato de Cdk1, realizamos ensayos quinasa *in vitro* en los que incubamos GST-Cdc14A wt o GST-Cdc14A(PD) con los complejos Cdk1-Ciclina B1 en presencia de γ^{32} P-ATP. Nuestros resultados muestran que la fosforilación de Cdc14A por estos complejos CDK

Resultados

es directa (figura 29B). Además, al comparar esta fosforilación en ausencia o presencia de Vanadato (inhibidor general de fosfatasas al cual Cdc14A es sensible), observamos que GST-Cdc14A wt tiene capacidad de eliminar su fosforilación por CDKs y que ésta es inhibida en presencia de Vanadato, lo que corrobora su capacidad de autodesfosforilación. Por otra parte, observamos que GST-Cdc14A wt es capaz de desfosforilar a GST-Cdc14A(PD) previamente fosforilada por los complejos Cdk1-Ciclina B1, lo que indica que la autodesfosforilación puede darse en trans (figura 29C). En conjunto, nuestros datos muestran que Cdc14A es sustrato directo de los complejos Cdk1-Ciclina B1 y tiene capacidad de revertir esta fosforilación.

Hemos comprobado que el estado de fosforilación tanto de Cdc14A wt como de su forma inactiva oscila de manera similar a lo largo del ciclo y que Cdc14A tiene capacidad de autodesfosforilación. Para estudiar cuándo se está llevando a cabo esta autodesfosforilación, comparamos los niveles de fosforilación de la forma activa e inactiva de Cdc14A en distintas fases del ciclo (G1/S, G2/M, Mitosis y G1). Como se observa en la figura 30A, HA-Cdc14A(PD) presenta mayor fosforilación que HA-Cdc14A wt en todas las fases estudiadas, especialmente en mitosis. Para facilitar la interpretación de los resultados, mostramos la cuantificación de Cdc14A fosforilada y no fosforilada respecto a la cantidad total (figura 30B). Estos datos sugieren que Cdc14A tiene cierta capacidad de autodesfosforilación a lo largo de todo el ciclo celular.

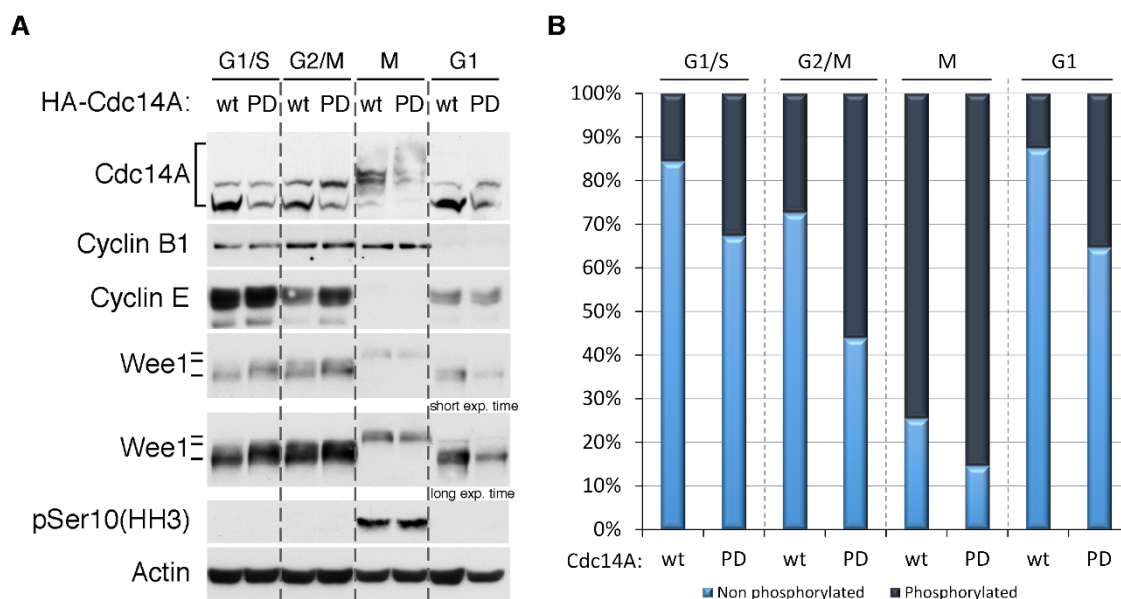


Figura 30. Autodesfosforilación de Cdc14A a lo largo del ciclo celular. **A)** Clones estables U2OS-HA-Cdc14A wt y U2OS-HA-Cdc14A(PD) se sincronizaron en G1/S (doble bloqueo con timidina), G2/M (doble bloqueo con timidina y 9 horas de crecimiento tras la liberación), Mitosis (12h de tratamiento con nocodazol y selección mediante *shake off*) o G1 (4 horas tras la liberación de nocodazol). **B)** Cuantificación de la proteína fosforilada (bandas superiores) y no fosforilada (banda inferior) expresadas como % respecto a la proteína total en cada caso.

La forma inactiva Cdc14A(PD) es desfosforilada a la salida de mitosis, lo que sugiere que en este punto del ciclo el cambio en los niveles de fosforilación no se debe a autodesfosforilación. Nuestros ensayos quinasa/fosfatasa *in vitro* muestran que Cdc14A tiene capacidad de autodesfosforilación intermolecular (figura 29C), por lo que cabe la posibilidad de que la proteína endógena, aunque poco abundante, estuviera regulando a la forma ectópica a la salida de mitosis. Para descartar esta hipótesis, analizamos la desfosforilación de Cdc14A(PD) durante la salida de mitosis en células hTERT-RPE (*human Telomerase Reverse Transcription-Retinal Pigment Epithelium*, Epitelio Pigmentario de Retina inmortalizado con el gen de la telomerasa) KO para Cdc14A (descritas en Mocciaro et al., 2010). Como se observa en la figura 31, a la salida de mitosis la desfosforilación de Cdc14A(PD) en células RPE wt y RPE Cdc14A^{-/-} es idéntica, lo que demuestra que la desfosforilación de Cdc14A en este caso no se debe a autodesfosforilación, sino a regulación por otras fosfatasa.

Resultados

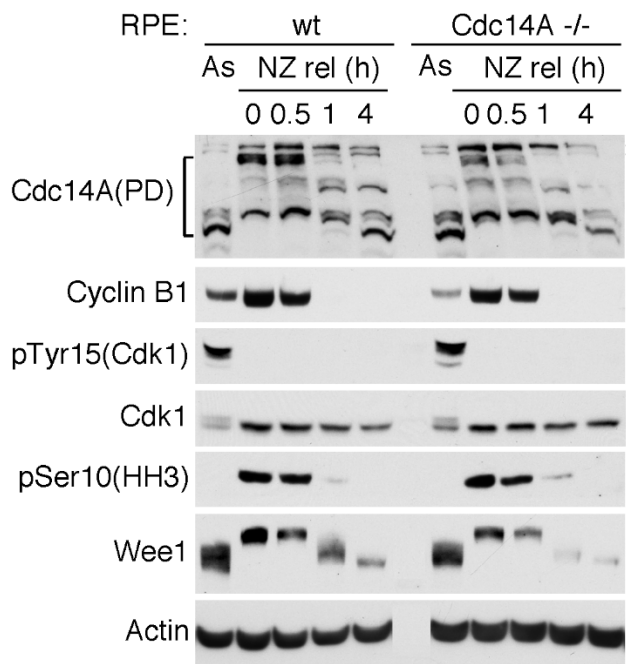


Figura 31. Cdc14A no se autodesfosforila a la salida de mitosis. Células RPE wt o RPE Cdc14A-/- se infectaron con retrovirus que contienen HA-Cdc14A(PD). A las 48h post-infección, se bloquearon con timidina (24h), tras lo que se liberaron en medio con nocodazol (12h). Las células mitóticas se recogieron mediante *shake off* y se liberaron en medio fresco durante los tiempos indicados. As = cultivos asincrónicos. * indica que la banda es inespecífica.

Los complejos CDK fosforilan a Cdc14A en Ser⁴¹¹, Ser⁴⁵³ y Ser⁵⁴⁹

Puesto que Cdc14A es un sustrato de los complejos CDK mitóticos, nos centramos en identificar los residuos fosforilados por éstos. En Cdc14A existen 7 sitios potenciales de fosforilación por CDKs, todos ellos correspondientes a la secuencia consenso mínima (S/I-P). Dos de estos sitios se encuentran en el dominio amino (ND) y los cinco restantes en el dominio carboxilo (CD) (figura 32).

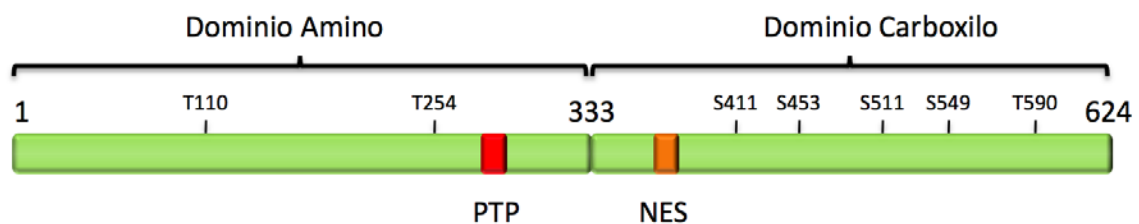


Figura 32. Residuos potenciales de fosforilación por CDKs en Cdc14A. El esquema muestra los residuos S/I-P y su ubicación en los dominios Amino y Carboxilo de la proteína. PTP = dominio catalítico fosfotirosina fosfatasa. NES = secuencia de exclusión nuclear.

Una primera aproximación fue analizar si ambos dominios de Cdc14A son fosforilados. Para ello generamos dos construcciones de la proteína, Flag-Cdc14A(ND) (aminoácidos 1 a 332) y Flag-Cdc14A(CD) (aminoácidos 333 a 574), y las expresamos en células HEK293T. Dejamos que estas células crecieran de manera asíncrona, o las tratamos con nocodazol o con OA. Procesamos las células tras los tratamientos y analizamos la movilidad electroforética de ambas construcciones en geles SDS-PAGE (figura 33). Observamos que Flag-Cdc14A(ND) no sufre cambios detectables en ninguna condición. Sin embargo, Flag-Cdc14A(CD) muestra un cierto retraso en su migración tras el tratamiento con nocodazol y un retraso mucho más marcado tras el tratamiento con OA, probablemente este último como consecuencia de fosforilaciones por diversas quinasas. Estos datos sugieren que los residuos fosforilados en mitosis se encuentran mayoritariamente en el dominio carboxilo de Cdc14A.

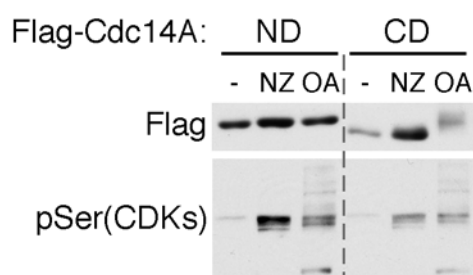


Figura 33. Cdc14A se fosforila en su dominio carboxilo. Células HEK293T se transfectaron con el dominio amino (ND) o el dominio carboxilo (CD) de Flag-Cdc14A. Tras 12h o 24h se trataron con nocodazol (50ng/ml, 12h) o con OA (0,5 μ M, 2h) respectivamente. La detección de pSer(CDKs) se utilizó como marcador del efecto de los tratamientos.

En paralelo y con el mismo objetivo, llevamos a cabo un análisis proteómico. Para ello, transfectamos células HEK293T con Myc-Cdc14A wt o Myc-Cdc14A(PD), y las tratamos con OA durante 2h para inducir un estado de alta actividad quinasas o con DMSO como control. Inmunoprecipitamos Cdc14A de cada una de las muestras utilizando un anticuerpo frente a la etiqueta Myc. Los inmunoprecipitados se sometieron a electroforesis en geles SDS-PAGE y la banda correspondiente a Cdc14A se tripsinizó para fragmentar la proteína en péptidos, los cuales se analizaron mediante SIMAC (*Sequential Elution from IMAC*, elución secuencial de péptidos unidos a iones metálicos) y MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*). Se identificaron en cada condición una serie de péptidos monofosforilados, todos ellos correspondientes al dominio carboxilo de Cdc14A, lo que corrobora nuestros datos

Resultados

previos. De este modo, en Cdc14A wt procedente de células no tratadas se identificaron 2 péptidos fosforilados y 8 péptidos (en los que se incluye uno de los dos anteriores) cuando las células son tratadas con OA. Este número aumenta en el caso de Cdc14A(PD) a partir de células tratadas, siendo 8 péptidos comunes a las formas activa e inactiva de Cdc14A. Estos datos ponen de nuevo de manifiesto la capacidad potencial de autodesfosforilación de la proteína. En cada uno de los péptidos identificados existen varias Serinas o Treoninas potencialmente fosforilables. Posteriores análisis realizados por LC-MS/MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*, cromatografía líquida espectrometría de masas/espectrometría de masas) muestran que los siguientes residuos se encuentran fosforilados (tabla 1).

Residuo	Cdc14A wt NT	Cdc14A wt + OA	Cdc14A(PD) + OA
Ser ^{347/348}	X	X	X
Ser ³⁵¹			X
Ser ³⁶³		X	
Ser ³⁶⁹		X	
Thr ⁴¹⁰			X
Ser ⁴¹¹			X
Ser ⁴²⁹		X	X
Ser ^{436/437}	X	X	X
Ser ⁴⁴¹			X
Ser ⁴⁵³	X	X	X
Ser ⁴⁵⁵	X	X	X
Thr ⁴⁵⁷		X	X
Thr ⁴⁶⁴ /Ser ⁴⁶⁵	X	X	X
Ser ⁴⁶⁷	X		
Ser ⁴⁶⁸		X	X
Ser ⁴⁷⁴		X	X
Ser ⁴⁷⁶		X	X
Ser ⁴⁷⁹			X
Ser ^{483/484}	X	X	X
Thr ⁴⁹²			X
Ser ⁵⁴⁰			X
Ser ⁵⁴⁹			X

Tabla 1. Resumen de los residuos fosforilados de Cdc14A. Células HEK293T se transfectaron con Myc-Cdc14A wt o Myc-Cdc14A(PD) y se trataron con 0,5 μ M Ácido Okadaico (OA) o DMSO durante 2 horas. Cdc14A se inmunoprecipitó utilizando un anticuerpo frente a Myc. Los IPs se analizaron mediante LC-MS/MS. En la tabla se señalan con (X) los aminoácidos fosforilados en cada una de las condiciones. En azul se destacan aquéllos residuos que son sitios consenso para CDKs. En algunos residuos se muestran dos números consecutivos, ya que por limitaciones técnicas no se ha podido discriminar cuál de los dos aminoácidos se encuentra fosforilado. NT = no tratada.

De estos residuos, tres corresponden a sitios potenciales de fosforilación por CDKs: Ser⁴¹¹, Ser⁴⁵³ y Ser⁵⁴⁹. Analizamos los péptidos que contienen estas tres Serinas mediante LC-MS/MS para determinar su grado de fosforilación. En la figura 34 se muestra la identificación de la fosforilación en Ser⁴⁵³ y el péptido al que pertenece (MALpS⁴⁵³PSATAK). Este mismo análisis se llevó a cabo con los péptidos TpS⁴¹¹PSCAFR y SSNSNGGGLNpS⁵⁴⁹PPGPHSAK (datos no mostrados).

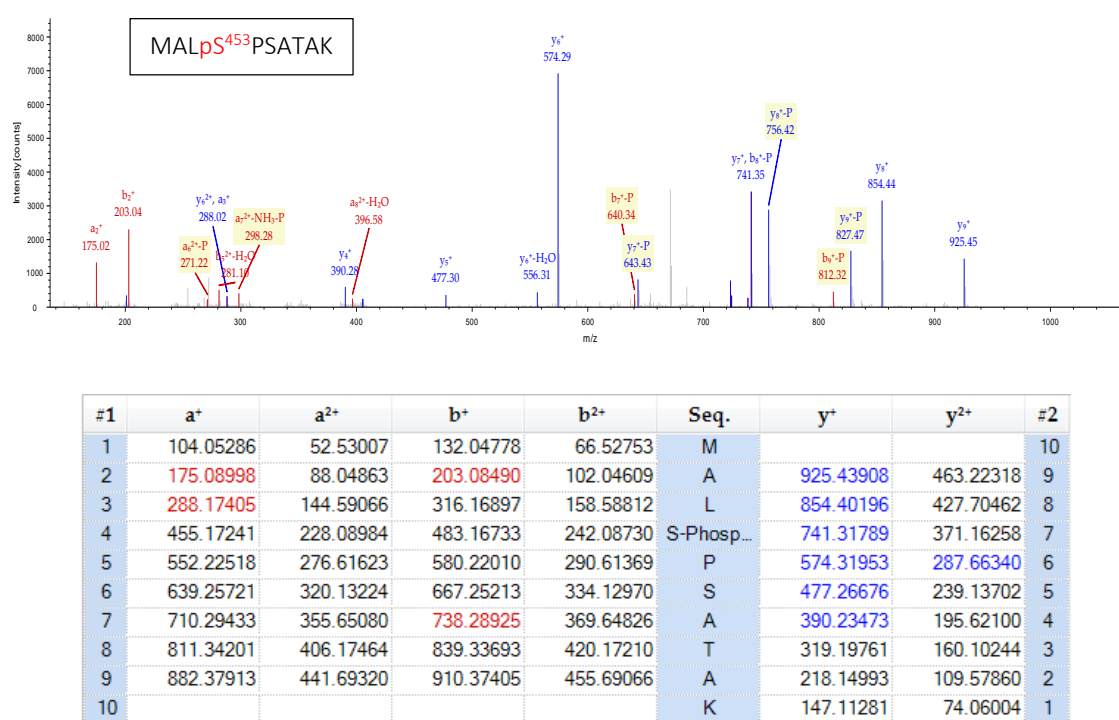


Figura 34. Espectro de masas obtenido utilizando la adquisición MSA. Espectro de disociación de colisión inducida del péptido MALpS⁴⁵³PSATAK identificado con SequestHT para Myc-Cdc14A(PD) obtenida de células tratadas con OA. El espectro es representativo de las diferentes condiciones analizadas y muestra fosforilación en Ser⁴⁵³. Los iones *b* y *a* se indican en rojo, los iones *y* en azul, y los iones precursores después de las pérdidas neutras (agua, amonio y/o ácido fosfórico) en verde.

Al analizar por separado cada una de estas tres Serinas, observamos que, a pesar de que la Ser⁴⁵³ se encuentra fosforilada en todas las condiciones, el grado de fosforilación es bajo en células no tratadas y mucho mayor tras el tratamiento con OA (figura 35 y tabla 2). En el caso de Ser⁴¹¹ y sobre todo de Ser⁵⁴⁹, los niveles de

Resultados

fosforilación en la proteína activa son bajos, menores que para la Ser⁴⁵³, y aumentan considerablemente tras el tratamiento con OA en la forma inactiva (tabla 2). De hecho, los niveles de fosforilación de las tres Serinas tras el tratamiento con OA son mucho mayores en Cdc14A(PD) que en Cdc14A wt, lo que sugiere que la fosfatasa tendría capacidad de autodesfosforilación incluso en mitosis. En conjunto, estos datos indican que Cdc14A es fosforilada por CDKs en Ser⁴¹¹, Ser⁵⁴⁹ y especialmente en Ser⁴⁵³, y se autodesfosforila en estos tres residuos, fundamentalmente en Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹.

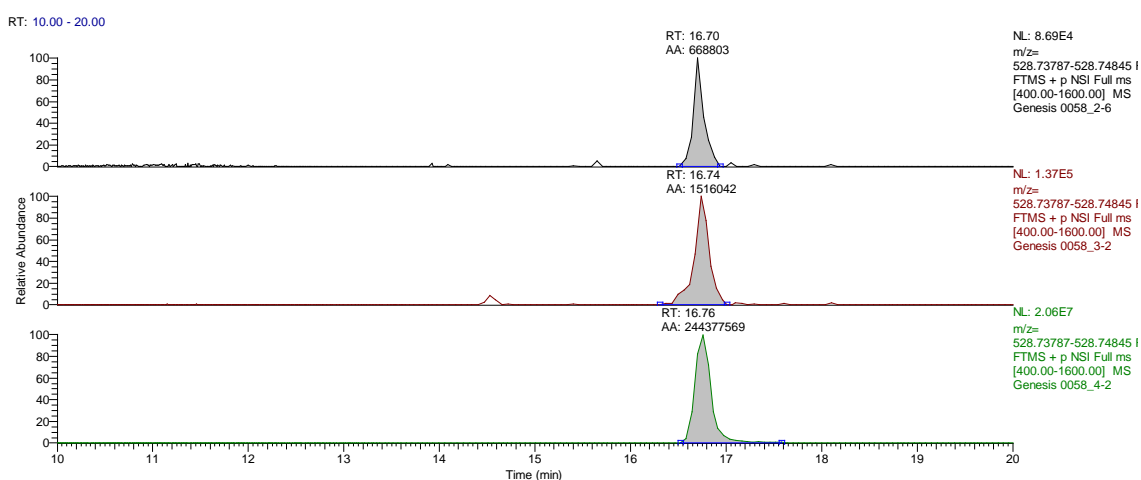


Figura 35. Cromatograma de corriente iónica total extraída para la masa 528.74340 Da que pertenece al fosfopéptido MALpSPSATAK (en el que se encuentra fosforilada Ser⁴⁵³) usando una tolerancia de masas de ± 10 p.p.m. Este mismo análisis se realizó para los péptidos TpSPSCAFR (en el que se encuentra fosforilada Ser⁴¹¹) y SSNSNGGNLNPSPPGPHSAK (en el que se encuentra fosforilada Ser⁵⁴⁹).

Residuo	Cdc14A wt NT	Cdc14A wt + OA	Cdc14A(PD) + OA
Ser ⁴¹¹	$1,59 \times 10^4$	$3,97 \times 10^5$	$3,67 \times 10^7$
Ser ⁴⁵³	$6,69 \times 10^5$	$1,52 \times 10^6$	$2,44 \times 10^8$
Ser ⁵⁴⁹	ND	42,57	$4,17 \times 10^5$

Tabla 2. Valores de la corriente iónica total extraída para cada masa. En la tabla se recogen los datos correspondientes a Ser⁴¹¹, Ser⁴⁵³ y Ser⁵⁴⁹ en cada condición, lo que permite comparar el grado de fosforilación de estos residuos. ND = no detectado. NT = no tratada.

Con el fin de validar los residuos de fosforilación por CDKs identificados mediante proteómica (Ser⁴¹¹, Ser⁴⁵³ y Ser⁵⁴⁹) y corroborar que no existe ningún otro que contribuya a la fosforilación de Cdc14A en mitosis, construimos mutantes no fosforilables y analizamos su movilidad electroforética, reflejo de su estado de

fosforilación en la célula. Mutamos individualmente a Alanina los cinco aminoácidos del dominio carboxilo que pertenecen a la secuencia S/T-P en Flag-Cdc14A(PD) (mutantes S411A, S453A, S511A, S549A y T590A) y transfectamos células HEK293T con Flag-Cdc14A wt, Flag-Cdc14A(PD) o cada uno de estos mutantes. Tras 24 horas de transfección, tratamos estas células con nocodazol y comparamos la movilidad electroforética de estas construcciones. Como ya se ha descrito, Flag-Cdc14A wt experimenta un retraso parcial en su movilidad como consecuencia de la fosforilación en mitosis (figura 36A, carril 2). Por su parte, la forma inactiva Flag-Cdc14A(PD) experimenta un mayor grado de fosforilación (carril 3), situación que se ve en parte revertida en los mutantes S411A, S453A y S549A (observar la desaparición de la banda superior de fosforilación en estos mutantes simples, carriles 4, 5 y 7). Además, el estado de fosforilación del doble mutante Flag-Cdc14A(PD) S411/549A (carril 9), revierte al de la proteína activa, lo que confirmaría que la desfosforilación de estas dos Serinas la lleva a cabo la propia Cdc14A. Finalmente, si a este doble mutante le sumamos una mutación en la tercera Serina identificada (carril 10), el patrón de fosforilación de Flag-Cdc14A(PD) S411/453/549A en mitosis es idéntico al de Flag-Cdc14A wt en células creciendo de forma asíncrona (carril 1).

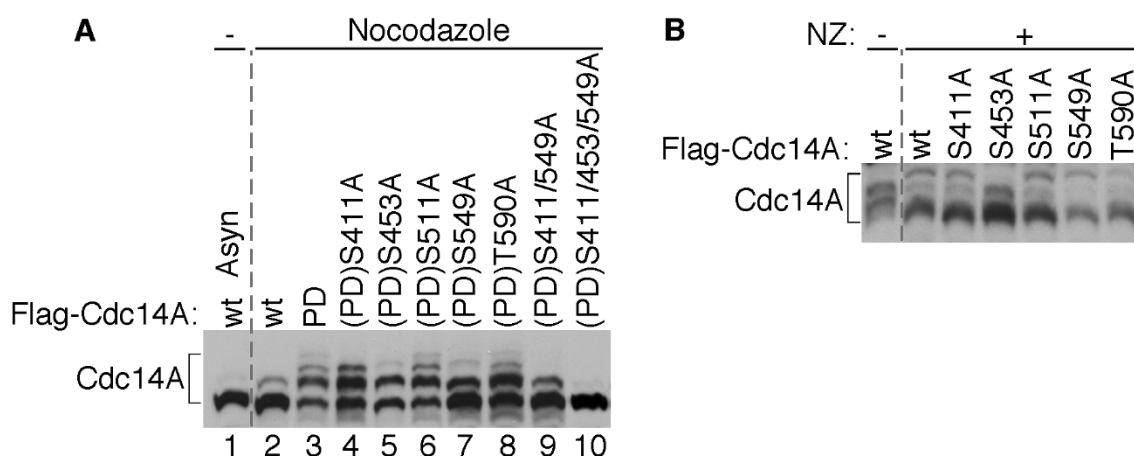


Figura 36. Cdc14A es fosforilada en Ser⁴¹¹, Ser⁴⁵³ y Ser⁵⁴⁹ en mitosis. Células HEK293T (A) o U2OS (B) se transfectaron con cada una de las construcciones de Flag-Cdc14A indicadas. Tras 24h se añadió DMSO o nocodazol durante 12h. En el caso de las U2OS las células mitóticas se recogieron mediante *shake off*. Los extractos procedentes de cada una de las líneas celulares se resolvieron mediante electroforesis en geles PhosTag™ y se analizaron con anti-Cdc14A.

Resultados

Estos resultados indican que la Ser⁴⁵³ es un residuo clave en la fosforilación de Cdc14A en mitosis y que Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹ son los residuos mayoritariamente autodesfosforilados en estas condiciones. La importancia de la Ser⁴⁵³ en la fosforilación en mitosis también fue comprobada de la misma manera con mutantes de la forma activa de Cdc14A, siendo el mutante S453A el único que revierte la fosforilación en mitosis de la proteína (figura 36B).

Para comprobar que efectivamente Cdc14A es fosforilada por Cdk1-Ciclina B1 en estos tres residuos, construimos y purificamos de *E. coli* la proteína recombinante GST-Cdc14A(PD) y sus mutantes no fosforilables por CDKs: S453A, S411/549A, S411/453/549A (3A), S411/453/511/549A (4A) y S411/453/511/549/T590A (5A). Con todas ellas realizamos ensayos quinasa *in vitro* con complejos Cdk1-Ciclina B1 en presencia de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. Como se puede observar en la figura 37, la fosforilación del mutante S453A es significativamente menor (37%) que la de la proteína wt, lo que indica que Cdc14A se fosforila en este residuo, el cual es de gran importancia en la fosforilación total de la proteína. Por su parte, el mutante S411/549A también presenta fosforilación reducida (50%) respecto a la proteína wt. Al combinar estas tres mutaciones (3A) la fosforilación por Cdk1-Ciclina B1 es aún menor (22%) y al añadir mutaciones en los otros dos residuos identificados por secuencia (mutantes 4A y 5A), no observamos una disminución significativa de la fosforilación respecto a la del mutante Cdc14A 3A. Estos datos apoyan en gran medida los resultados obtenidos por proteómica e indican que la fosforilación de Cdc14A por Cdk1 se da preferentemente en Ser⁴⁵³ y las Serinas 411 y 549.

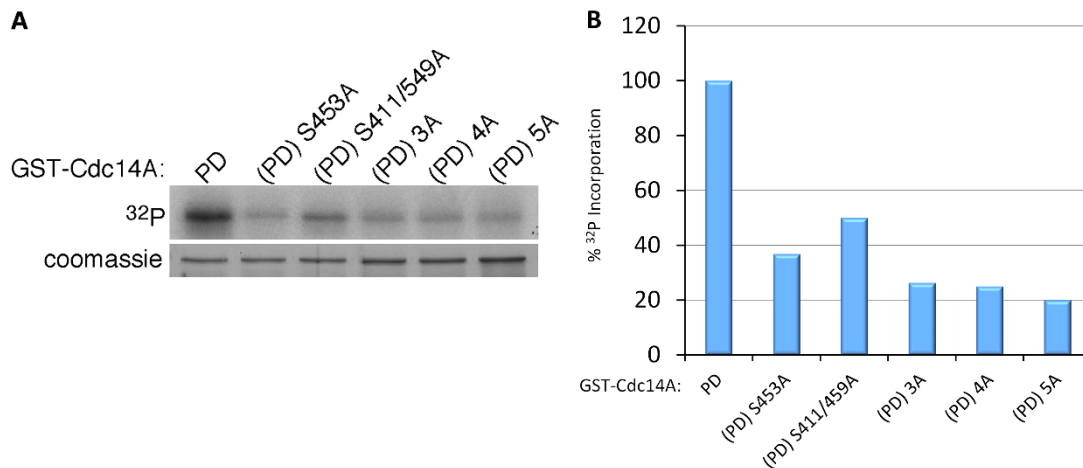


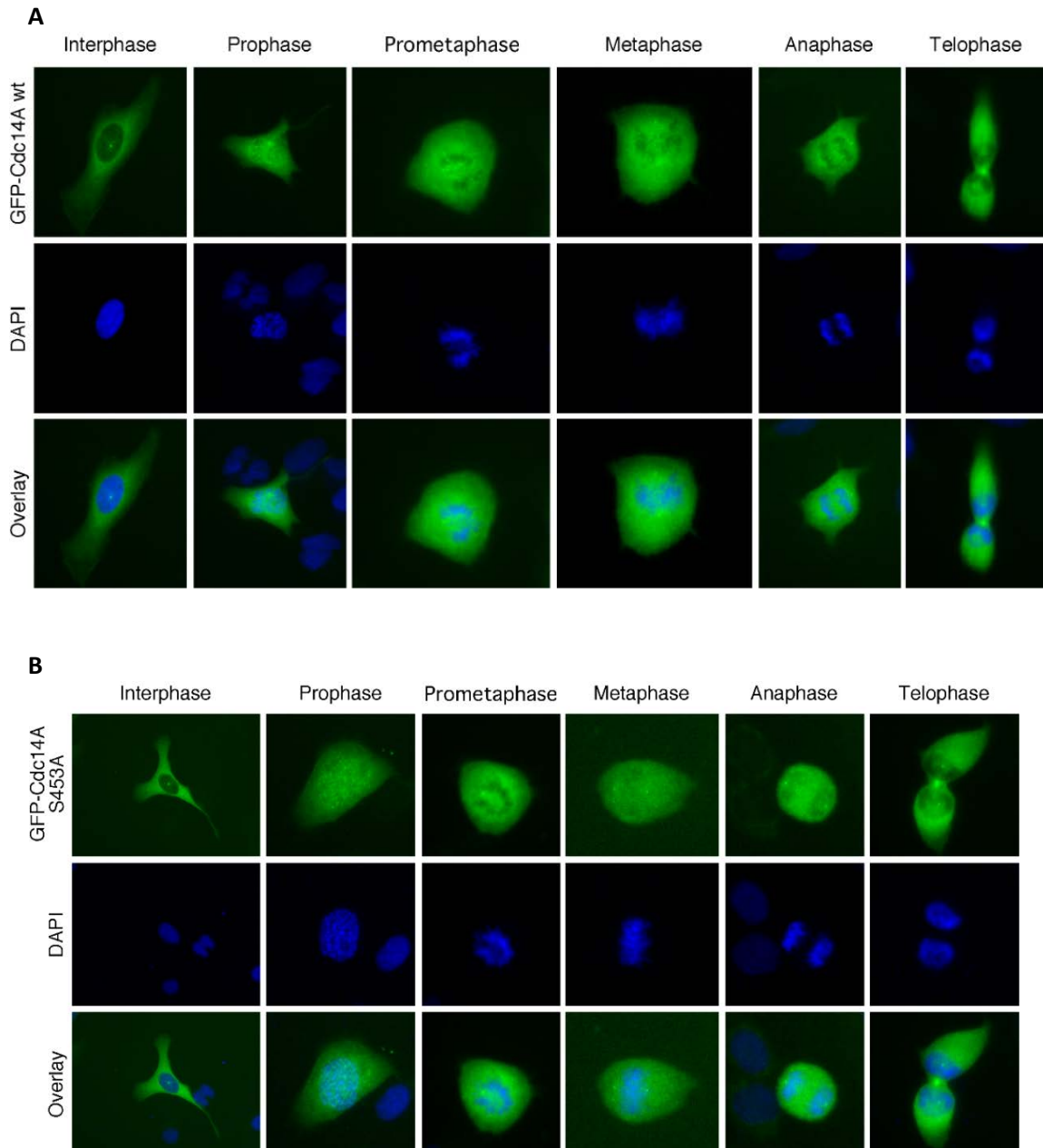
Figura 37. Los complejos Cdk1-Ciclina B1 fosforilan a Cdc14A preferentemente en Ser⁴⁵³, Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹.
A) GST-Cdc14A(PD) y los mutantes indicados se purificaron de *E.coli*. Las proteínas purificadas se sometieron a fosforilación con complejos Cdk1-Ciclina B1 en presencia de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. Las muestras se resolvieron en gel SDS-PAGE y tras la electroforesis el gel se tiñó con Coomassie para detectar la cantidad de proteína. La incorporación del isótopo en cada reacción se analizó mediante autorradiografía. **B)** La normalización de la cantidad de ^{32}P incorporado frente a la cantidad total de GST-Cdc14A(PD) se representa en la gráfica, considerando una incorporación del 100% en el caso de la proteína recombinante no mutada.

Caracterización funcional de la fosforilación de Cdc14A por los complejos CDK

Finalmente, estudiamos el significado funcional de la fosforilación de Cdc14A por los complejos CDK mitóticos. Una posibilidad es que el cambio en la localización de Cdc14A (centrosomal durante interfase y difusa por toda la célula durante mitosis) esté controlado por fosforilación. Cdc14A es fosforilada en Ser⁴⁵³ a la entrada en mitosis, coincidiendo con el momento en que se libera mayoritariamente de centrosomas, por lo que nos planteamos que este residuo pudiera formar parte del mecanismo de regulación de la localización de la fosfatasa. Para analizar esta hipótesis, transfectamos células U2OS con EGFP-Cdc14A wt o EGFP-Cdc14A S453A y analizamos su localización en interfase y mitosis. Como puede observarse, EGFP-Cdc14A wt se localiza como ha sido descrito, en centrosomas y citoplasma durante interfase y difunde por toda la célula durante mitosis (figura 38A) (Kaiser et al., 2002; Mailand et al., 2002a). El mutante EGFP-Cdc14A S453A presenta la misma localización que la proteína wt a lo largo de todo el ciclo (figura 38B). Además, dado que nuestros resultados de proteómica indican que en mitosis Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹ son desfosforiladas eficientemente por la propia Cdc14A,

Resultados

analizamos la localización de un mutante doble fosfomimético (S411/549E = 2E). Como se observa en la figura 38C, la localización de este mutante es idéntica a la de la proteína wt. Por lo tanto, podemos decir que la falta de fosforilación de la Ser⁴⁵³ y de autodesfosforilación de los residuos Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹ no parece afectar a la regulación de la localización de Cdc14A a lo largo del ciclo celular.



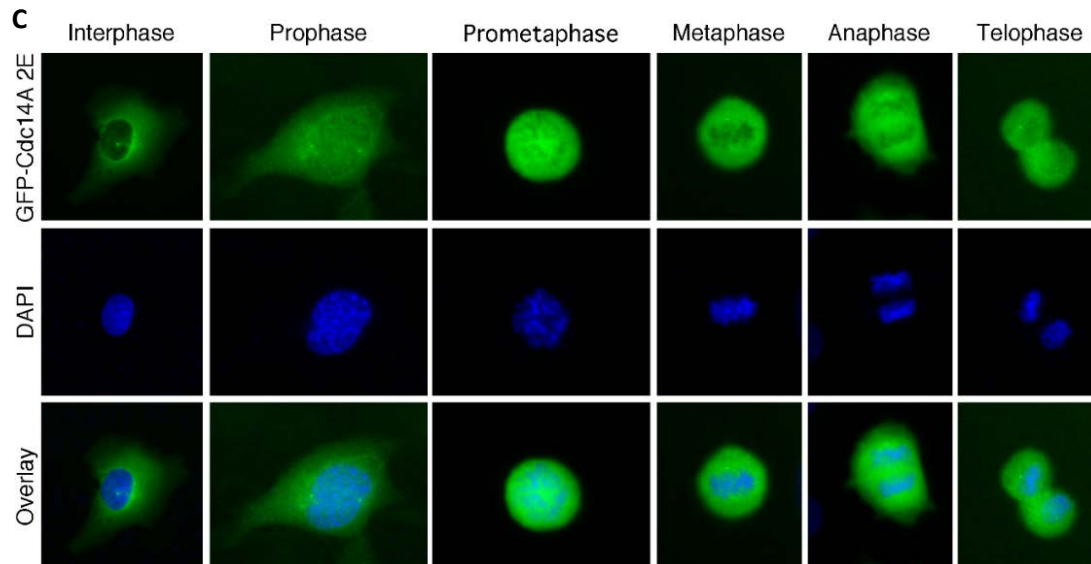


Figura 38. Localización subcelular de Cdc14A wt y los mutantes Cdc14A S453A y Cdc14A S411/459E. Se transfectaron células U2OS con EGFP-Cdc14A wt (A), EGFP-Cdc14A S453A (B) o EGFP-Cdc14A S411/549E (2E) (C). Tras 24h, las células se fijaron con paraformaldehído y los núcleos se tiñeron con DAPI. Las imágenes se adquirieron con un objetivo 40x y se analizaron con el programa *Metamorph*.

Se ha descrito que la actividad de Cdc14A no varía significativamente a lo largo del ciclo celular (Kaiser et al., 2002). Según nuestros datos de proteómica, Cdc14A obtenida a partir de cultivos creciendo de forma asincrónica aparece fosforilada en la Ser⁴⁵³, lo que podríamos interpretar como una fosforilación basal en este residuo a lo largo de todo el ciclo. Con el fin de comprobar si la fosforilación de esta Serina afecta a la actividad catalítica de Cdc14A, analizamos la actividad de un mutante no fosforilable Flag-Cdc14A S453A y un mutante fosfomimético Flag-Cdc14A S453E frente a la actividad de Flag-Cdc14A wt. Como sustrato utilizamos pNPP (*p-Nitrophenyl Phosphate*, ver Materiales y Métodos) y Flag-Cdc14A(PD) se usó como control negativo. Observamos que el mutante no fosforilable presenta mayor actividad que la proteína wt, mientras que la actividad del mutante fosfomimético no varía significativamente (figura 39), lo que indica que, si bien Cdc14A es activa en todos los casos, la ausencia de fosforilación en Ser⁴⁵³ incrementaría su actividad.

Resultados

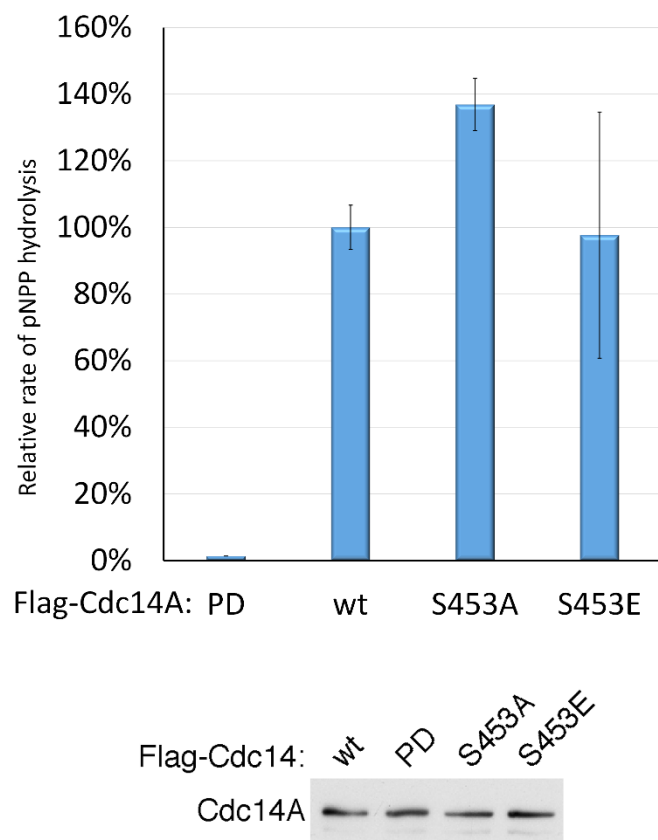


Figura 39. Efecto de la fosforilación de Ser⁴⁵³ en la actividad de Cdc14A. Flag-Cdc14A(PD), Flag-Cdc14A wt, Flag-Cdc14A S453A y Flag-Cdc14A S453E se inmunoprecipitaron de células HEK293T utilizando un anticuerpo anti-Flag. Los inmunoprecipitados se sometieron a ensayos fosfatasa utilizando pNPP como sustrato. Se realizaron medidas de la absorbancia a 405nm cada 10 minutos durante 90 minutos. Las reacciones se hicieron por duplicado. La actividad de Cdc14A se determinó en base a su capacidad para hidrolizar pNPP y mediante análisis de regresión lineal. El *western blot* muestra la cantidad de inmunoprecipitado utilizada en cada reacción frente a la que se han normalizado los datos.

Puesto que nuestros resultados sugieren que la fosforilación de Cdc14A en Ser⁴⁵³ podría ser inhibidora de la actividad fosfatasa y dado que hemos observado una gran hiperfosforilación de Cdc14A tras el tratamiento con OA, analizamos si existe algún cambio en la actividad de la fosfatasa debido a un incremento global en sus niveles de fosforilación. Para ello, comparamos la actividad de Cdc14A wt procedente de células no tratadas o tratadas con OA. Como se observa en la figura 40, la actividad de Cdc14A se ve levemente reducida tras el tratamiento con OA, lo que sugiere que la hiperfosforilación tendría un papel inhibitor. Hemos de tener en cuenta que el resultado de estos experimentos puede verse afectado por la posible autodesfosforilación de Cdc14A durante los ensayos, revirtiéndose así, al menos en parte, a su estado de fosforilación en condiciones control.

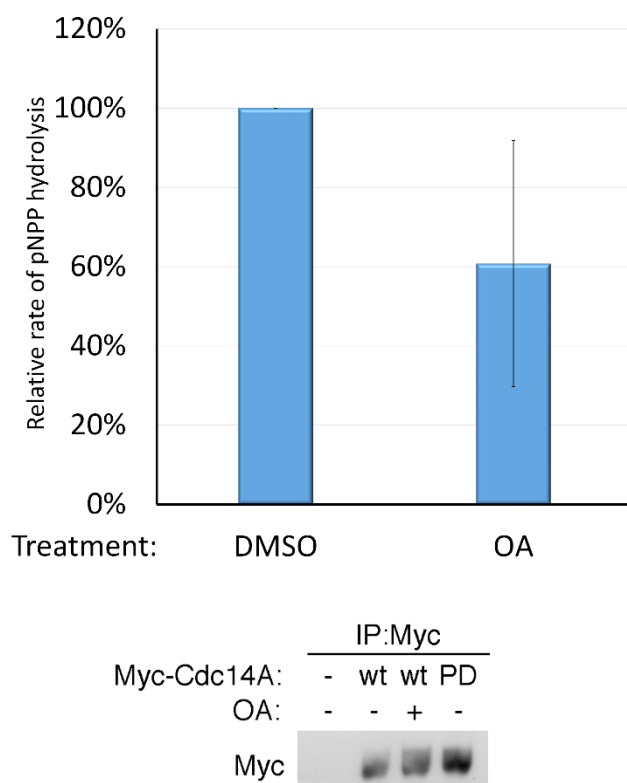


Figura 40. Efecto de la fosforilación tras el tratamiento con OA sobre la actividad de Cdc14A. Myc-Cdc14A wt se inmunoprecipitó de células HEK293T tratadas con OA o DMSO durante 2h. Myc-Cdc14A(PD) se utilizó como control negativo (no mostrada en la gráfica). Los inmunoprecipitados se sometieron a ensayos fosfatasa utilizando pNPP como sustrato. Se realizaron medidas de la absorbancia a 405nm cada 10 minutos durante 90 minutos. Las reacciones se hicieron por duplicado. La actividad de cada reacción se determinó mediante análisis de regresión lineal. El *western blot* muestra la cantidad de inmunoprecipitado utilizada en cada reacción frente a la que se han normalizado los datos.

De la misma forma, analizamos la actividad de Cdc14A en mitosis frente a su actividad en interfase. En la figura 41 se observa que la actividad catalítica de Flag-Cdc14A wt en mitosis no varía significativamente respecto a interfase.

Resultados

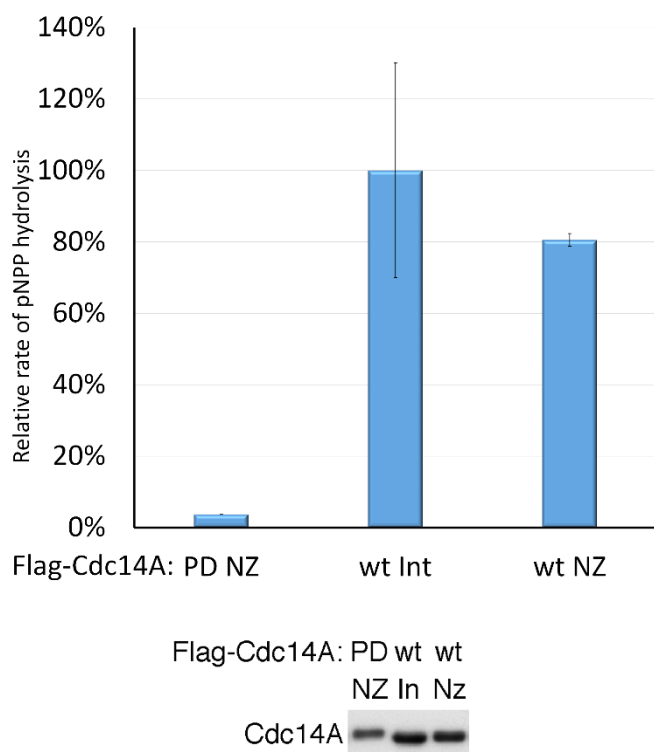


Figura 41. Efecto de la fosforilación en mitosis sobre la actividad de Cdc14A. Flag-Cdc14A wt se inmunoprecipitó de células U2OS estables en mitosis o interfase utilizando un anticuerpo frente a la etiqueta. Flag-Cdc14A(PD) se utilizó como control negativo. Los inmunoprecipitados se sometieron a ensayos fosfatasa utilizando pNPP como sustrato. Se realizaron medidas de la absorbancia a 405nm cada 10 minutos durante 90 minutos. Las reacciones se hicieron por duplicado. La actividad de cada reacción se determinó mediante análisis de regresión lineal. El *western blot* muestra la cantidad de inmunoprecipitado utilizada en cada reacción frente a la que se han normalizado los datos.

Sin embargo, al igual que sucede en los experimentos anteriores, no podemos descartar que la fosforilación de Cdc14A en mitosis se esté perdiendo a consecuencia de su capacidad de autodesfosforilación, por lo que analizamos la actividad de los correspondientes mutantes en estas condiciones. Nuestros resultados previos indican que en mitosis Cdc14A se fosforila en Ser⁴⁵³ y se autodesfosforila principalmente en Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹ (figura 36). Por ello analizamos la actividad de los mutantes Flag-Cdc14A S453A, Flag-Cdc14A S411/549E (2E) y un triple mutante combinando estas mutaciones Flag-Cdc14A S453A+S411/549E (A+2E) obtenidos a partir de células U2OS mitóticas. En estas condiciones, las diferencias entre Cdc14A wt y el mutante S453A no fueron significativas (figura 42). Sin embargo, el mutante doble Flag-Cdc14A 2E y el triple Flag-Cdc14A A+2E presentan mayor actividad que la proteína wt, lo que sugiere que la fosforilación de Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹ activaría a Cdc14A y, por tanto, su autodesfosforilación en estos residuos tendría un papel inhibitorio.

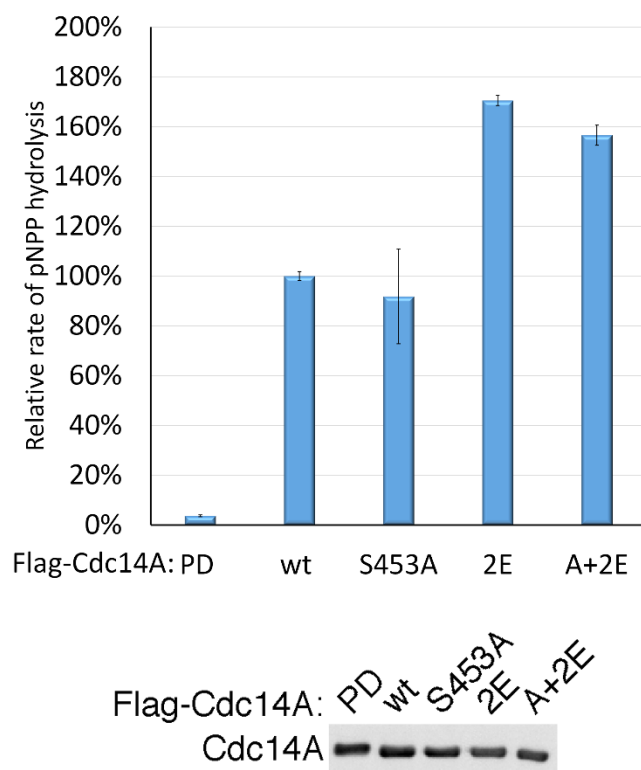


Figura 42. Actividad fosfatasa de Cdc14A y diferentes mutantes de fosforilación purificados de células mitóticas. Flag-Cdc14A wt, Flag-Cdc14A S453A, Flag-Cdc14A S411/549E (2E) y Flag-Cdc14A S453A +S411/549E (A+2E) se inmunoprecitaron a partir de células U2OS mitóticas que expresan de manera estable las diferentes formas de Cdc14A. Flag-Cdc14A(PD) se utilizó como control negativo. Los inmunoprecitados se sometieron a ensayos fosfatasa utilizando pNPP como sustrato. Se realizaron medidas de la absorbancia a 405nm cada 10 minutos durante 90 minutos. Las reacciones se hicieron por duplicado. La actividad de cada reacción se determinó mediante análisis de regresión lineal. El *western blot* muestra la cantidad de inmunoprecipitado utilizada en cada reacción frente a la que se han normalizado los datos.

De este modo, la fosforilación en Ser⁴⁵³ junto con la autodesfosforilación, principalmente en Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹, podrían modular la actividad catalítica de Cdc14A. Puesto que Cdc14A regula la transición G2/M impidiendo la activación prematura de los complejos CDK, el aumento de su actividad producido por la falta de fosforilación en Ser⁴⁵³ o la fosforilación constitutiva de Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹ podría verse reflejado en un mayor retraso de la entrada en mitosis y, por lo tanto, en un menor índice mitótico en los cultivos celulares que sobreexpresan este mutante. Para analizar esta posibilidad, utilizamos líneas estables U2OS que sobreexpresan Flag-Cdc14A wt, Flag-Cdc14A S453A, Flag-Cdc14A S411/549E (2E) o Flag-Cdc14A S453A+S411/549E (A+2E), y células U2OS wt como control. Como puede verse en la figura 43A, la sobreexpresión de Cdc14A en todos

Resultados

los casos correlaciona con mayores niveles de Wee1 y un aumento de la fosforilación inhibitoria de Cdk1 en Tyr¹⁵. Sin embargo, la cuantificación de la fosforilación en Ser¹⁰ de la Histona H3 (pHH3) en cada una de estas líneas celulares creciendo de manera asincrónica no muestra diferencias importantes entre las células que sobreexpresan Flag-Cdc14A o cada uno de los mutantes (figura 43B).

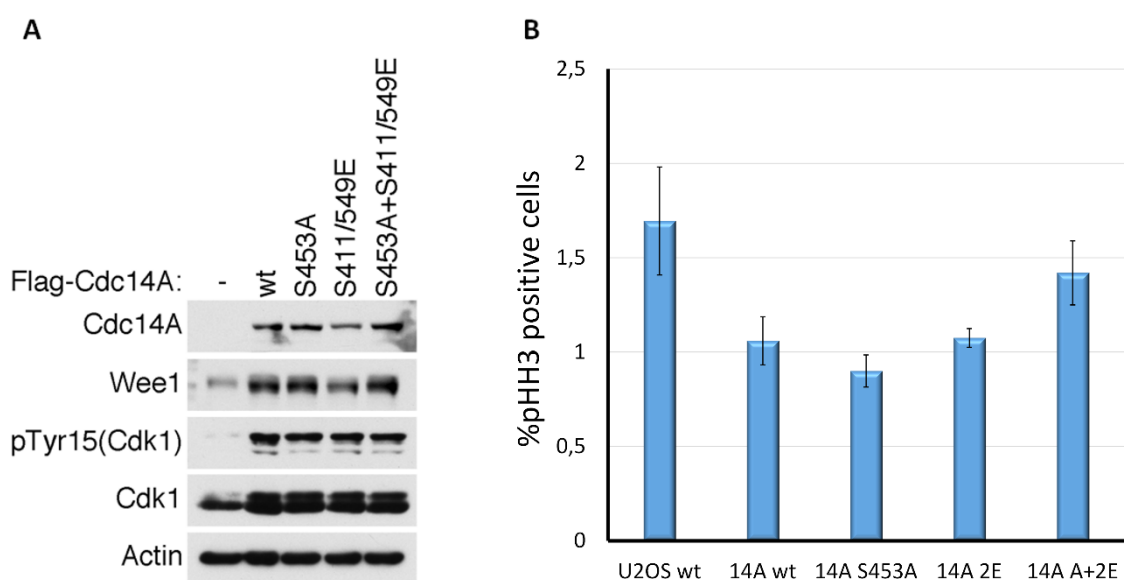


Figura 43. Efecto de la sobreexpresión de Flag-Cdc14A wt o sus mutantes en Serina en células humanas. Líneas estables U2OS que sobreexpresan Flag-Cdc14A wt o los diferentes mutantes de fosforilación se crecieron de manera asincrónica y se recogieron para el análisis por *western blot* de las proteínas indicadas (**A**) y del porcentaje de células pHH3 positivas por citometría de flujo (**B**). Como control se utilizaron células U2OS wt.

No vemos pues un efecto inhibitorio significativo de la actividad de Cdc14A debido a fosforilación, como mucho, una cierta modulación de esta actividad catalítica. Por otro lado, hemos visto que Cdc14A es capaz de autodesfosforilarse también en mitosis (figura 30). Sin embargo, hemos observado que en células U2OS la sobreexpresión de HA-Cdc14A wt produce la desfosforilación de Wee1 en todas las fases del ciclo excepto en mitosis (figura 30). Esto puede deberse a que Cdc14A wt no puede contrarrestar la alta actividad CDK mitótica o a que concretamente en mitosis Wee1 no sea regulada por esta fosfatasa debido a su regulación negativa mediada por fosforilación. Sería preciso realizar análisis adicionales para comprobar esta posibilidad.

En conjunto, nuestros ensayos *in vitro* demuestran que en mitosis Cdc14A tiene actividad independientemente de su estado de fosforilación, aunque quizás esta actividad sea sólo un reflejo de su capacidad de autodesfosforilación, no un reflejo de la actividad sobre sus otros sustratos. De hecho, la ausencia de un fenotipo claro con estos niveles de sobreexpresión de la proteína wt sugiere que estos experimentos deberían llevarse a cabo en un sistema que nos permitiera alcanzar niveles mucho mayores tanto de Cdc14A wt como de sus mutantes para poder analizar si existen diferencias entre ellas.

Nuestro objetivo inmediato consiste en profundizar en el estudio de la regulación de la actividad de Cdc14A por fosforilación en Ser⁴¹¹, Ser⁴⁵³ y Ser⁵⁴⁹, teniendo en cuenta la posibilidad de que existan otros residuos implicados en el mismo mecanismo. Además, estamos estudiando si estos residuos están implicados en otras funciones como la regulación de la estabilidad de la proteína o su interacción con sus sustratos o reguladores.

DISCUSIÓN

1. REGULACIÓN DE LA TRANSICIÓN G2/M POR Cdc14A A TRAVÉS DE Wee1 EN CÉLULAS HUMANAS

Las fosfatasa Cdc14 actúan como reguladores de la mitosis en eucariotas, con distintas funciones moleculares dependiendo del organismo. El mecanismo de activación de los complejos CDK mitóticos depende de un preciso balance entre fosforilaciones y desfosforilaciones en el que los propios complejos tienen un papel fundamental. Las fosforilaciones inhibitoras llevadas a cabo por las quinasas Wee1 y Myt1 deben ser revertidas por las fosfatasa Cdc25 para permitir la entrada en mitosis. A su vez, tanto Cdc25 como Wee1 y Myt1 son fosforiladas por los complejos CDK para inducir su activación o inhibición respectivamente. En humanos, Cdc14A se opone directamente a la activación de los complejos CDK en la transición G2/M. En concreto, el trabajo previo realizado en nuestro laboratorio demostró que en células humanas Cdc14A regula a los complejos CDK mitóticos (Cdk1-Ciclina B1) a través de la inhibición de Cdc25A y Cdc25B (Esteban et al., 2006; Vazquez-Novelle et al., 2010). A raíz de estos datos, decidimos analizar si Cdc14A podría estar regulando también a Wee1 o Myt1 como parte de este mecanismo de inhibición de la entrada en mitosis.

Identificación de Wee1 como sustrato de Cdc14A

A la entrada en mitosis, Wee1 y Myt1 son fosforiladas por CDKs para promover su degradación e inhibición respectivamente. En este trabajo hemos comprobado que la desregulación de Cdc14A no altera el estado de fosforilación de Myt1 (datos no mostrados). Este hecho no es sorprendente, dado que la localización subcelular de ambas proteínas es distinta durante G2/M, encontrándose Cdc14A en centrosomas y citoplasma, y Myt1 asociado a la membrana del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, por lo tanto es improbable que exista una regulación directa de la fosforilación de Myt1 por Cdc14A. Sin embargo, en el caso de Wee1 hemos demostrado que la depleción de Cdc14A acelera notablemente su fosforilación y degradación en G2/M, y que este efecto es específico de la falta de la fosfatasa. Por otro lado, hemos comprobado que la sobreexpresión de Cdc14A, la cual retrasa la entrada en mitosis, impide la fosforilación de Wee1 y como consecuencia ésta se acumula. Este fenotipo podría ser una

Discusión

consecuencia indirecta de la desregulación de los complejos CDK a través de las fosfatasa Cdc25, como se ha descrito anteriormente (Vazquez-Novelle et al., 2010). Sin embargo, nuestros datos muestran que existe una regulación directa de Wee1 por Cdc14A. En concreto, Cdc14A se une al dominio amino regulador de Wee1 y lo desfosforila en residuos CDKs.

De los dieciséis sitios S/T-P presentes en la secuencia de Wee1, en el momento de iniciar este trabajo sólo dos habían sido descritos como fosforilados por Cdk1 *in vivo*: Ser¹²³ y Thr²³⁹ (Okamoto and Sagata, 2007; Watanabe et al., 2005; Watanabe et al., 2004), aunque posteriormente se identificó también la Ser⁴⁷² (Owens et al., 2010). Se había descrito que la fosforilación por CDKs en Ser¹²³ promueve la fosforilación de Wee1 en Ser¹²¹ y Ser⁵³ por CK2 y Plk1, respectivamente, lo que determina la ubiquitinación y degradación de Wee1 en la transición G2/M (Watanabe et al., 2005; Watanabe et al., 2004). En el estudio de la regulación de la estabilidad de Wee1 dependiente de fosforilación, hemos corroborado que la mutación de Ser¹²³ a Alanina conlleva una disminución drástica de la fosforilación de Wee1 durante la transición G2/M y un aumento en la estabilidad de la proteína, como ya había sido descrito (Watanabe et al., 2005; Watanabe et al., 2004). Además, hemos identificado la Ser¹³⁹ como un residuo fosforilado por CDKs. Nuestra caracterización de este residuo muestra que su fosforilación está implicada en la regulación de la estabilidad de Wee1 en la transición G2/M, de manera que la mutación de esta Serina a Alanina aumenta notablemente la estabilidad de la proteína y su mutación a un residuo fosfomimético incrementa su degradación. Hemos demostrado que la fosforilación tanto en Ser¹²³ como en Ser¹³⁹ por los complejos CDK mitóticos es necesaria para que se produzca el reconocimiento y fosforilación de Wee1 por Plk1, ya que la mutación de cualquiera de ellas a Alanina disminuye la interacción con Plk1 y la interacción de un doble mutante no fosforilable prácticamente es indetectable. La fosforilación por Plk1 es el evento que dispara la degradación de Wee1 y permite la rápida activación de los complejos Cdk1-Ciclina B1 a la entrada en mitosis. Según nuestros resultados, estas dos Serinas son fosforiladas de manera independiente y tienen efecto sinérgico en el control de la estabilidad de Wee1. La Ser¹³⁹ no pertenece a una secuencia de reconocimiento por Plk1, por lo que podría afectar a la interacción de Wee1 con la quinasa produciendo cambios conformacionales

que facilitaran o estabilizaran la unión con Ser¹²³. Además, la fosforilación en Ser¹³⁹ aparece ya desde G1/S, por lo que es probable que en estas fases sea fosforilada por Cdk2 y participe junto con Ser¹²³ en el mecanismo de degradación basal durante interfase (Watanabe et al., 2005). Nuestros resultados muestran que a pesar de que un doble mutante a Alanina en los residuos Ser¹²³ y Ser¹³⁹ es marcadamente más estable que la proteína wt en mitosis, sigue habiendo degradación, lo que sugiere que existen mecanismos adicionales que regulan la estabilidad de Wee1 en la transición G2/M. Se han descrito otros residuos cuya fosforilación regula la degradación de Wee1, como Ser⁴⁷², también potencialmente fosforilada por CDKs (Owens et al., 2010) y los cambios en su localización a la entrada en mitosis también parecen ser dependientes de fosforilación (Li et al., 2010; Katayama et al., 2005). En conjunto, estos datos indican que la hiperfosforilación de Wee1 es un proceso altamente regulado en células humanas y que es crítico para la entrada en mitosis.

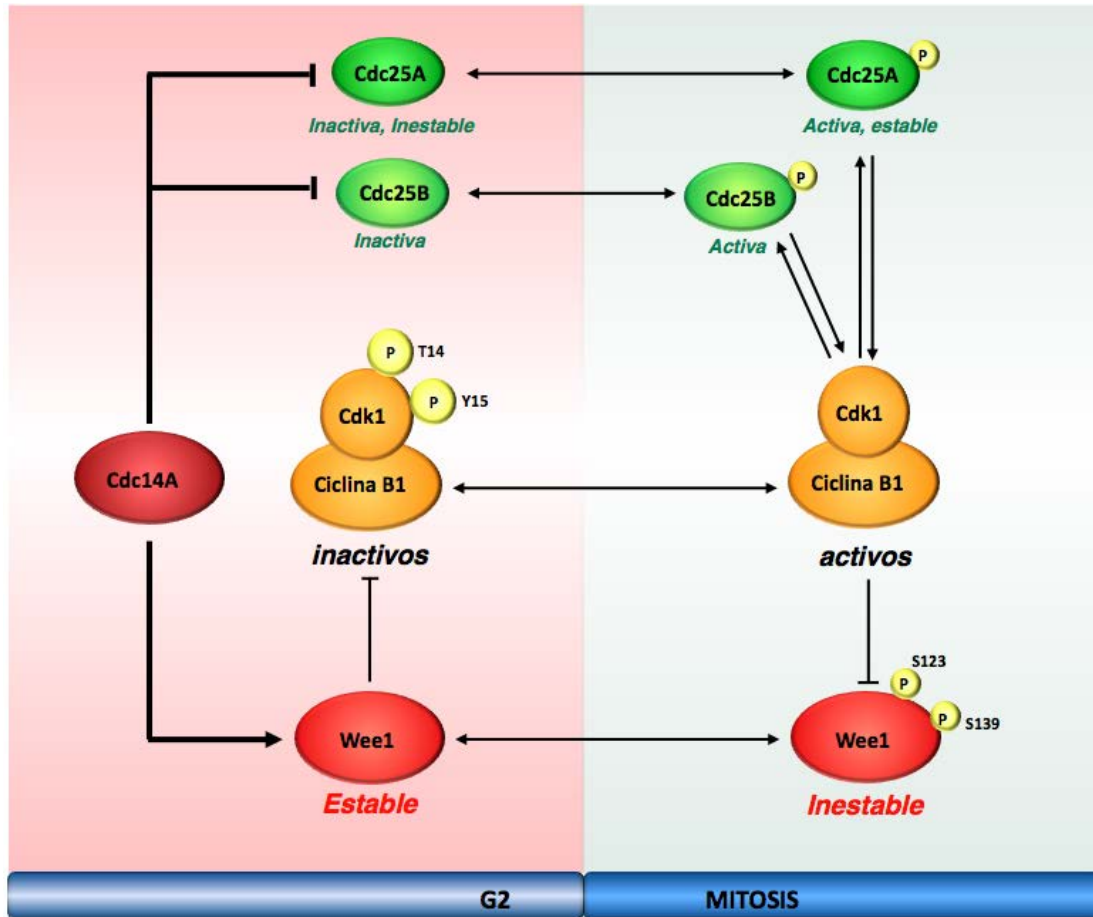
Nuestros datos muestran que Cdc14A es un regulador clave del estado de fosforilación de Wee1 en la transición G2/M. Hemos comprobado que Ser¹²³ y Ser¹³⁹ son desfosforiladas directamente por Cdc14A y el silenciamiento de esta fosfatasa aumenta considerablemente la fosforilación de Wee1 en ambos residuos, con el consiguiente incremento en su degradación. Por lo tanto, Cdc14A actuaría como un freno de la entrada prematura en mitosis también a través de la estabilización de Wee1 por desfosforilación directa de Ser¹²³ y Ser¹³⁹.

Por otro lado, se ha descrito que la fosfatasa Fcp1 es responsable de la desfosforilación de la Thr²³⁹ de Wee1 en la transición de mitosis a G1 (Visconti et al., 2012). Sin embargo, los datos disponibles sugieren que existe alguna otra fosfatasa capaz de desfosforilarla en otros residuos. Según nuestros resultados, el silenciamiento de Cdc14A no afecta a la desfosforilación de Wee1 a la salida de mitosis, por lo que descartamos que Cdc14A pudiera estar contribuyendo a la regulación de Wee1 en este punto del ciclo.

En conclusión, proponemos un modelo de regulación de la entrada en mitosis en el cual la fosfatasa Cdc14A se opone a la activación prematura de los complejos CDK

Discusión

mitóticos, no sólo a través de la inhibición de Cdc25A y Cdc25B, sino también de la estabilización de Wee1 mediante la desfosforilación de Ser¹²³ y Ser¹³⁹ (Modelo 1).



Modelo 1. Funciones de Cdc14A en la regulación de la entrada en mitosis. En G2/M los complejos Cdk1-Ciclina B1 se mantienen inhibidos por fosforilación de Cdk1 en Thr¹⁴ y Tyr¹⁵. Cdc14A favorece esta situación mediante la inhibición de Cdc25B y la inhibición y desestabilización de Cdc25A. Al mismo tiempo, promueve la estabilización de Wee1 mediante desfosforilación de Ser¹²³ y Ser¹³⁹. De este modo el balance entre fosforilaciones y desfosforilaciones mantiene inactivos a los complejos CDK hasta que la célula está lista para dividirse, por lo que Cdc14A sería un inhibidor de la entrada en mitosis.

2. POSIBLE REGULACIÓN DE Wee1 POR Cdc14B

En vertebrados existen dos isoformas de fosfatasa Cdc14 con alta homología: Cdc14A y Cdc14B. Varios de los sustratos identificados son comunes para ambas isoformas (Ji et al., 2012; North and Verdin, 2007; Wu et al., 2010) y presentan capacidad para rescatar la delección de Flp1 en *S. pombe* (Vazquez-Novelle et al., 2005), lo que indica que también comparten algunas funciones. Es posible que los sustratos comunes a Cdc14A y Cdc14B sean regulados por una u otra fosfatasa dependiendo de la fase del ciclo celular o de determinadas condiciones de estrés celular o de activación de algún *checkpoint*.

Hemos demostrado que Wee1 es sustrato de Cdc14A. Nuestros datos sugieren que también podría ser sustrato de Cdc14B. Hemos comprobado que en condiciones de sobreexpresión Cdc14B interacciona con Wee1 y es capaz de desfosforilarla en Ser¹²³ y Ser¹³⁹ con la misma eficiencia que Cdc14A. Sin embargo, el silenciamiento de Cdc14B no parece afectar a la estabilidad o estado de fosforilación de Wee1. Este hecho plantea varias hipótesis. La primera de ellas es que realmente Wee1 no sea un sustrato de Cdc14B. Por otro lado, cabe la posibilidad de que Cdc14B desfosforile a Wee1 sólo en determinadas condiciones celulares. En este sentido, se ha descrito que Cdc14B sale del nucléolo hacia el nucleoplasma en respuesta a estrés genotóxico o irradiación ionizante, y contribuye a la activación del *checkpoint* en G2, mediante la activación de APC/C^{Cdh1} y la consecuente degradación de Plk1 (Bassermann et al., 2008). Bajos niveles de esta quinasa impiden la degradación de Claspina y de Wee1, contribuyendo así a la inhibición de Cdk1 y de la entrada en mitosis. Como consecuencia de este mecanismo, Wee1 se estabilizaría ante un daño al ADN por la falta de Plk1. A raíz de estos datos, nos planteamos la posibilidad de que Cdc14B estuviera regulando a Wee1 no sólo de manera indirecta a través de Plk1, sino también de manera directa por desfosforilación en Ser¹²³ y Ser¹³⁹ para estabilizarla en respuesta a daño al ADN. Sin embargo, no tenemos aún datos concluyentes a este respecto. El papel de Cdc14B en la respuesta al daño al ADN, mediada al menos en parte por Wee1, es actualmente línea de estudio de nuestro grupo.

3. REGULACIÓN DE LA ENTRADA EN MITOSIS: POSIBLE RELACIÓN ENTRE Cdc14A Y LA RUTA DE Gwl

La entrada en mitosis es controlada fundamentalmente por un balance entre fosforilaciones y desfosforilaciones de numerosas proteínas. Aunque existen varias quinasas implicadas en dichas fosforilaciones, la actividad principal en este punto del ciclo es llevada a cabo por los complejos CDK, necesarios para la entrada y progresión por las primeras fases de mitosis. Por su parte, fosfatasa como PP2A y Cdc14A contrarrestan esa actividad CDK durante G2 para impedir una entrada prematura en mitosis. El mecanismo que inactiva las fosfatasa para inclinar la balanza a favor de las fosforilaciones es complejo y aún no del todo conocido, sin embargo, se sabe que la quinasa Gwl juega un papel importante reprimiendo la actividad fosfatasa de PP2A a través de Arpp19 y Ensa para permitir la entrada en mitosis (Gharbi-Ayachi., 2010). Estudios en líneas celulares han descrito que la inhibición de PP2A-B55 mediada por Gwl es necesaria para que se produzca la entrada en mitosis.

Podría decirse que Cdc14A actúa en paralelo con PP2A e incluso que su papel sería redundante con el de PP2A. Ambas fosfatasa contrarrestan la actividad de los complejos Cdk1-Ciclina B1 y, probablemente, tienen sustratos en común. Teniendo en cuenta estas consideraciones, sería interesante analizar si existe una relación entre el eje Gwl-Arpp19/Ensa-PP2A y Cdc14A en G2/M.

Resultados preliminares de nuestro laboratorio muestran que la sobreexpresión de Cdc14A es capaz de revertir parcialmente la inhibición de PP2A con OA (datos no mostrados). En concreto, en lo que respecta a Wee1, hemos observado que Cdc14A contrarresta la hiperfosforilación de Wee1 debida al tratamiento con OA, lo que sugiere que tanto ella como PP2A estarían regulando a Wee1. Ambas fosfatasa inhibirían la activación de los complejos CDK a través de las fosfatasa Cdc25 y de Wee1. Sería necesario profundizar en el estudio de la regulación de estos sustratos por PP2A y Cdc14A para saber si ambas fosfatasa desfosforilan los mismos residuos o cada una de ellas regula a estas proteínas a distintos niveles. También es posible que lleven a cabo esta regulación en distintos compartimentos celulares, Cdc14A mayoritariamente en centrosomas y PP2A-B55 en el resto de la célula.

En contraposición al papel de PP2A a la entrada en mitosis, análisis recientes de células procedentes de ratones KO para Gwl han mostrado que a pesar de la falta de Gwl, la entrada en mitosis se da de manera normal produciéndose un colapso mitótico después de la rotura de la envuelta nuclear por activación de PP2A-B55 a destiempo (Alvarez-Fernandez et al., 2013). Este hecho sugiere que Gwl y, por tanto, la inhibición de PP2A-B55 no serían determinantes para permitir la activación de los complejos CDK, sino para la progresión por las primeras fases de mitosis una vez que ésta ya ha comenzado. En contraposición, la inhibición de Wee1 sí que se considera como un requisito necesario para la activación de los complejos CDK mitóticos, la cual se inicia en los centrosomas. Por todo ello, según este modelo, el papel de Cdc14A en la transición G2/M que hemos descrito actuaría como un paso previo al mecanismo de control llevado a cabo por Gwl, probablemente inhibiendo la activación temprana de Cdk1-Ciclina B1 en los centrosomas hasta que la célula está preparada para dividirse.

Nuestros resultados preliminares indican que Cdc14A y Gwl co-localizan en centrosomas en células humanas durante interfase y mitosis. Además, por experimentos de co-inmunoprecipitación hemos visto interacción entre ambas proteínas. Esto sugiere que una sea sustrato de la otra. Hemos realizado ensayos *in vitro* en los que Gwl es capaz de fosforilar a Cdc14A y, al mismo tiempo, Cdc14A revierte parcialmente la autofosforilación de Gwl (datos no mostrados). Es posible que durante la entrada en mitosis, Gwl pudiera fosforilar a Cdc14A de manera directa para inhibirla al tiempo que PP2A es inhibida por Ensa y Arpp19, de manera que la inhibición de la actividad fosfatasa fuera más robusta para favorecer la rápida activación de los complejos CDK mitóticos y la progresión por las primeras fases de mitosis. De esta manera, la regulación de los sustratos comunes de Cdc14A y PP2A resultaría más precisa. Sería interesante estudiar la potencial regulación de Cdc14A por Gwl en células humanas, analizando si la quinasa afecta directamente a su estado de fosforilación y sus consecuencias o si Cdc14A podría ser regulada por los sustratos de Gwl, Ensa o Arpp19, mediante un mecanismo similar al descrito para PP2A. Además, sería necesario confirmar que la autofosforilación de Gwl puede ser revertida por Cdc14A. Hasta ahora se ha descrito que Cdc14A tan sólo desfosforila Serinas o Treoninas seguidas de Prolina, con preferencia por las primeras (Bremmer et al., 2012), por lo que parece poco

probable que sea capaz de regular la autofosforilación de Gwl. Sin embargo, Gwl es también sustrato de los complejos CDK para activarse (Vigneron et al., 2011), lo que la convierte en sustrato potencial de Cdc14A y sería otro nivel adicional de la inhibición de la entrada en mitosis o esta desfosforilación también podría darse a la salida de la misma.

4. CONTROVERSIA SOBRE LAS FUNCIONES DE LAS FOSFASTASAS Cdc14

Nuestros datos demuestran que Cdc14A es un regulador de la entrada en mitosis. En nuestros estudios hemos empleado líneas celulares humanas y estrategias de silenciamiento de la expresión de Cdc14A mediante siRNA (Ovejero et al., 2012; Vazquez-Novelle et al., 2010). Otros grupos de investigación han generado y descrito líneas KO de Cdc14A y Cdc14B, pero los resultados obtenidos con ellas son en algunos casos contradictorios respecto a los obtenidos mediante el silenciamiento de estos genes con otras técnicas como los siRNA o shRNA (*short hairpin Ribonucleic Acid*, ARN de horquillas cortas) (Mocciaro et al., 2010; Mocciaro and Schiebel, 2010). Así, células RPE carentes de Cdc14A y células tumorales HCT116 carentes de Cdc14B, presentan una progresión normal por el ciclo y demuestran que ninguna de las dos fosfatasas es esencial para la viabilidad celular. Lo que es más, ninguna de las líneas estables KO presenta ninguno de los defectos descritos en experimentos con siRNA específicos para una u otra fosfatasa, como son problemas en la separación de los centrosomas, defectos en la salida de mitosis o problemas en el establecimiento del *checkpoint* de G2 tras un daño en el ADN (Berdougo et al., 2008; Mocciaro et al., 2010). Por otra parte, las células carentes de Cdc14A o Cdc14B presentan menor capacidad para reparar el daño al ADN tanto endógeno como exógeno, lo que se traduce en un aumento de los focos de γ -H2AX (marcador de rotura de doble cadena) e hipersensibilidad a la irradiación (Mocciaro et al., 2010).

Existen varias explicaciones posibles para estas discrepancias entre los resultados obtenidos mediante el uso de siRNAs y las células KO. La primera de ellas es la limitación técnica intrínseca de los siRNAs, los cuales pueden no alcanzar niveles de silenciamiento del 100% de la expresión de la proteína. Dicho de otro modo, los fenotipos observados mediante esta técnica podrían ser producto del silenciamiento parcial de las Cdc14, no

de su falta total. Cabe la posibilidad de que la falta total de Cdc14 implique que sus funciones puedan ser asumidas por otras fosfatasa, mientras que una disminución de sus niveles sólo afecte a alguna de dichas funciones sin activar ningún mecanismo de compensación. Otra posible razón sería el hecho de que las células KO estables podrían haber sufrido un proceso de adaptación durante su selección, de manera que la falta de una de las isoformas de Cdc14 podría verse compensada por la presencia de la otra o incluso por otras fosfatasa con las que tuviera redundancia funcional, como podrían ser las PPs. En este sentido, los experimentos con siRNA no permiten esta adaptación, reflejando las consecuencias inmediatas de su carencia en la célula. Tampoco es descartable que los fenotipos varíen según la línea celular estudiada o el momento del ciclo en el que se hace efectiva la falta de la fosfatasa. También existen discrepancias entre las líneas KO y los resultados obtenidos con MEFs KO para Cdc14B, ya que éstos no presentan mayor tasa de daño endógeno ni problemas en la reparación tras irradiación en comparación con MEFs control (Guillamot et al., 2011). En este contexto, sería imprescindible contar con modelos animales KO simples de cada una de las Cdc14 para analizar las contribuciones específicas de Cdc14A y Cdc14B en el control del ciclo celular y los *checkpoints*, así como con un modelo doble KO que permitiera asegurar que la falta de una isoforma no está siendo compensada por la otra.

5. REGULACIÓN DE Cdc14A POR FOSFORILACIÓN EN CÉLULAS HUMANAS

Al inicio de nuestro trabajo, se había sugerido que Cdc14A podía ser una fosfoproteína (Kaiser et al., 2002; Kaiser et al., 2004) y nuestras propias observaciones apoyaban esta hipótesis, pero no se había caracterizado esta posible regulación dependiente de fosforilación. Dada la imposibilidad de trabajar con la proteína endógena, ya que no es reconocida por ningún anticuerpo disponible, hemos considerado conveniente trabajar mayoritariamente con clones estables de células que expresan niveles muy bajos de la proteína, en los que además de confirmar una localización subcelular correcta de Cdc14A, no hemos observado las consecuencias obvias de su sobreexpresión (retraso en el ciclo, pérdida de viabilidad o defectos en la segregación cromosómica). Utilizando esta estrategia experimental, hemos demostrado que en células humanas, Cdc14A se encuentra fosforilada a lo largo de todo el ciclo

Discusión

celular y experimenta hiperfosforilación en mitosis dependiente de CDKs, de manera similar a la descrita para XCdc14A en *Xenopus* (Kaiser et al., 2004). Además, hemos comprobado que Cdc14A tiene capacidad de autodesfosforilación, al igual que Flp1, aunque nuestros datos indican que esta autorregulación es distinta a la descrita para su homólogo en *S. pombe* (Wolfe et al., 2006), donde Flp1 es inhibida a la entrada en mitosis por fosforilación de los complejos CDK y se activa por autodesfosforilación para participar en la salida de mitosis. Nuestros datos sugieren que la autodesfosforilación de Cdc14A humana se daría a lo largo de todo el ciclo celular y, concretamente a la salida de mitosis, su desfosforilación sería llevada a cabo principalmente por otras fosfatasas, no por la propia actividad de la proteína. Existe la posibilidad de que la otra isoforma de Cdc14A presente en células humanas, Cdc14B, pudiera desfosforilarla en este punto del ciclo, ya que ambas proteínas se encuentran difusas por toda la célula durante mitosis (Kaiser et al., 2002; Mailand et al., 2002a). Sin embargo, nuestros resultados *in vitro* muestran que Cdc14B no es capaz de desfosforilar a Cdc14A (datos no mostrados), por lo que es poco probable que Cdc14B esté regulando a Cdc14A en las células. Como candidatas a desfosforilar a Cdc14A a la salida de mitosis, proponemos a PP2A o PP1, ambas con papeles descritos en este punto del ciclo y cuya inhibición por OA produce un notable incremento en la fosforilación de Cdc14A, como hemos demostrado. El papel de la autodesfosforilación de Cdc14A será discutido más adelante.

En cuanto al significado funcional de la fosforilación de Cdc14A, una posibilidad es que esté regulando la actividad catalítica de la proteína. Se ha descrito que esta fosfatasa es activa a lo largo de todo el ciclo celular, con leves oscilaciones en su actividad que muestran un leve incremento de ésta en fase S y salida de mitosis (Kaiser et al., 2002). No obstante, dado que hemos demostrado que Cdc14A tiene capacidad de autodesfosforilación, cabe la posibilidad de que el resultado de los ensayos realizados por Kaiser y colaboradores se viera alterado por la autodesfosforilación de esta proteína, lo que enmascararía posibles diferencias en su actividad en distintas fases del ciclo. Por otra parte, también se ha propuesto que el dominio carboxilo terminal de Cdc14A estaría inhibiendo su propia actividad catalítica (Yuan et al., 2007). Mediante análisis proteómicos, el uso de mutantes, y ensayos quinasa/fosfatasa *in vitro* hemos identificado tres residuos de fosforilación por CDKs en Cdc14A: Ser⁴¹¹, Ser⁴⁵³ y Ser⁵⁴⁹,

todos en el dominio carboxilo y entre los que la Ser⁴⁵³ tiene un papel predominante. Nuestros resultados muestran que por sí sola, la mutación de Ser⁴⁵³ a Alanina en mitosis revierte el estado de fosforilación de Cdc14A al de la proteína en interfase, lo cual indica que este residuo es crítico para su fosforilación en mitosis (figura 36B). Además, también en mitosis, un doble mutante S411/549A de la forma inactiva de Cdc14A presenta la misma movilidad que la forma activa, lo que sugiere que estos dos residuos serían los que la fosfatasa estaría autorregulando (figura 36A). Por otra parte, al comparar el patrón de fosforilación de las formas activa e inactiva de Cdc14A al inicio de mitosis, podemos deducir que también es este estado de máxima fosforilación parece estar autodesfosforilándose. Esto indica que Cdc14A también es activa en este punto del ciclo. Sin embargo, nuestros datos sugieren que esta fosforilación global reduciría en cierta medida su actividad a la entrada en mitosis.

Nuestros resultados indican que la fosforilación en las tres Serinas identificadas estaría modulando la actividad catalítica de Cdc14A. Hemos comparado la actividad de Cdc14A procedente de células control y tratadas con ácido okadaico para inducir su hiperfosforilación. Nuestros resultados muestran una ligera disminución de la actividad de Cdc14A tras el tratamiento con OA. De igual modo, observamos que la actividad de la fosfatasa purificada de células en mitosis es menor que cuando la obtenemos de células en interfase. Sin embargo, en estos ensayos no podemos descartar la limitación anteriormente mencionada por la posible autodesfosforilación de Cdc14A durante los mismos. Por ello, analizamos la actividad de los mutantes de fosforilación S453A, S411/549E y S453A+S411/549E mediante ensayos fosfatasa *in vitro*. Esta aproximación indica que la fosforilación en Ser⁴⁵³ disminuiría la actividad de Cdc14A mientras que la fosforilación en Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹ la aumentaría. El mutante Cdc14A S411/549E, que simula una fosforilación constitutiva en esos residuos y, por lo tanto, anula la autodesfosforilación, es más activo en los ensayos fosfatasa, lo que sugiere que Cdc14A se autorregularía para mantenerse en un estado de actividad basal. De esta manera, cuando la actividad CDK aumenta a la entrada en mitosis, el incremento en la fosforilación de Ser⁴⁵³ implicaría la inhibición de Cdc14A. Sin embargo, la fosforilación concomitante en Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹ actuaría de forma opuesta, activándola. Nuestros resultados *in vitro* sugieren que la fosforilación en Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹ sería más determinante

Discusión

para el control de la actividad de Cdc14A que la de Ser⁴⁵³, por lo que estaríamos ante un balance entre la actividad quinasa y la actividad fosfatasa autorreguladora para modular su actividad, aunque Cdc14A nunca llega a ser completamente inhibida. Además, es posible que la fosforilación de estos residuos en combinación con otros, como los regulados por Plk1, contribuyan a modificar la conformación de la proteína para regular su activación debido a cambios estructurales.

Durante la transición G2/M, Cdc14A desfosforila a las fosfatasas Cdc25 y a Wee1 para frenar la entrada en mitosis y, según nuestros datos, podría ser más activa en este punto del ciclo que en mitosis. Nuestros resultados preliminares, comparando la capacidad para disminuir el índice mitótico de Cdc14A wt y sus mutantes en las células, no muestran apenas diferencias entre ellos. Este hecho podría deberse a los bajos niveles de sobreexpresión de nuestras líneas celulares estables o a que los residuos fosforilados por Cdk1-Ciclina B1 por sí solos no regulen de manera significativa la actividad de la proteína, por lo que sería necesario combinarlos con mutaciones en los residuos potencialmente fosforilados por otras quinasas identificados mediante proteómica. Para profundizar en este estudio, además sería interesante analizar la entrada en mitosis en condiciones de sobreexpresión de Cdc14A wt o sus mutantes teóricamente más activos Cdc14A S453A, Cdc14A S411/549E y Cdc14A S453A+S411/549E. Como ya hemos descrito, la sobreexpresión de la proteína wt produce un retraso de la entrada en mitosis, pero es posible que la sobreexpresión de alguno de los mutantes mencionados incremente este retraso de manera significativa, lo que indicaría que la fosforilación de Ser⁴⁵³ o la autodesfosforilación en las otras dos Serinas (Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹) sería necesaria para inactivar a Cdc14A y permitir la entrada en mitosis. Otra aproximación, complementaria a la anterior, sería analizar la capacidad de sus mutantes no fosforilables o fosfomiméticos para rescatar la entrada en mitosis prematura producida por la depleción de la fosfatasa, ya que cambios en su actividad tendrían como resultado un rescate con mayor o menor eficiencia.

En G2/M, Cdc14A es activa para impedir la activación prematura de los complejos CDK mitóticos y se ha propuesto que desde el inicio de mitosis debe ser inhibida para permitir el alineamiento de los cromosomas en metafase, ya que un mutante más activo retrasa este proceso y el inicio de anafase (Yuan et al., 2007). Sería interesante

comprobar la capacidad de los mutantes mencionados anteriormente para retrasar esta entrada en mitosis en condiciones similares a las descritas por Yuan y colaboradores. Por otra parte, es cierto que, aunque nuestros datos muestran una menor actividad de Cdc14A en mitosis, no se trata de un efecto muy marcado. Por lo tanto es posible que la fosforilación de Cdc14A regule su capacidad de actuar sobre sustratos específicos más que su actividad intrínseca. En este sentido, cuando analizamos el efecto de Cdc14A sobre Wee1 en mitosis, comprobamos que la sobreexpresión de Cdc14A en células mitóticas no altera el estado de hiperfosforilación de Wee1 (figura 30). Esto podría explicarse por la alta actividad CDK, pero también por la imposibilidad de Cdc14A de actuar sobre su sustrato Wee1, mediada quizás por fosforilación en determinados residuos. Tras su inhibición a la entrada en mitosis, se produce la activación de Cdc14A mediante fosforilación por Plk1 probablemente en la transición metafase-anafase (Yuan et al., 2007), lo que coincidiría con el inicio de la desfosforilación de Ser⁴⁵³, que unida a la fosforilación por Plk1 aumentaría la actividad de la fosfatasa para participar en la salida de mitosis. Sin embargo, se considera que Cdc14A es dispensable para este proceso, participando únicamente en la activación de Cdh1 (Bembenek y Yu, 2001). Sería interesante profundizar en el estudio de la importancia de la regulación de Cdc14A a partir de metafase y comprobar si la desfosforilación de determinados residuos afecta a la función de Cdc14A durante las últimas fases de mitosis. En experimentos preliminares, hemos analizado la cinética de salida de mitosis en células U2OS que expresan de manera estable Cdc14A wt o sus mutantes S453A, S411/549E y S453A+S411/549E, pero no hemos observado ninguna diferencia respecto a células control. Creemos que esto se debe a que los niveles de sobreexpresión en estas líneas celulares no son lo suficientemente elevados como para producir un fenotipo evidente, especialmente dado que las que han alcanzado mitosis tras el tratamiento con nocodazol siempre son las que menores niveles de Cdc14A expresan. La regulación de Cdc14A durante la salida de mitosis en células humanas podría tener puntos en común con los mecanismos descritos para Flp1 en *S. pombe*, aunque con algunas modificaciones. En el caso de Flp1, eventos de fosforilación y desfosforilación estrictamente regulados en el tiempo parecen controlar los distintos niveles de actividad de la fosfatasa que determinarían la desfosforilación ordenada de sus sustratos (Wolfe et al., 2006). Este mecanismo podría estar parcialmente conservado en células humanas,

Discusión

por cambios en su actividad catalítica o en la afinidad por sus sustratos. Nuestros resultados preliminares sugieren que la fosforilación en Ser⁴⁵³ no parece afectar a la interacción con Wee1 y, probablemente, tampoco con Plk1. No obstante, sería interesante comprobar además si la fosforilación regula la interacción con Cdh1 a la salida de mitosis, ya que es posible que Cdc14A fosforilada en Ser⁴⁵³ no interaccione de manera eficiente con Cdh1 y hasta que no se inicie su desfosforilación no pueda reconocerla para favorecer su activación.

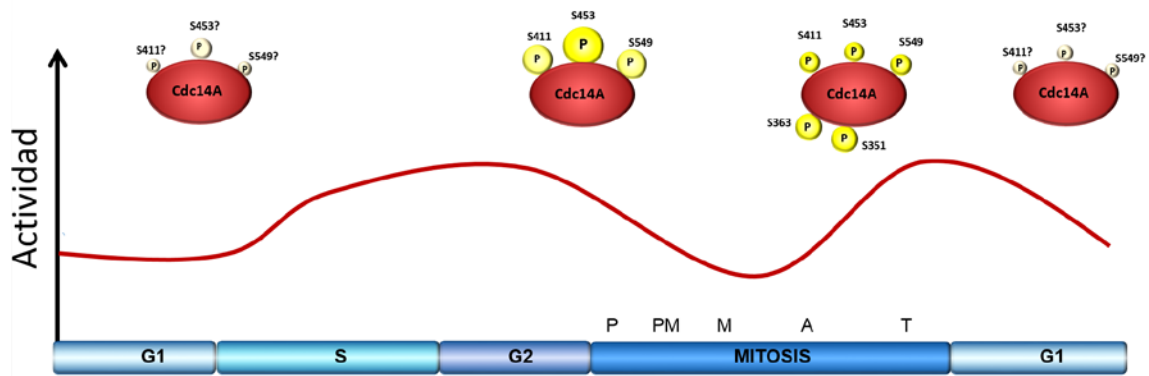
También hemos analizado la posible implicación de la fosforilación de Cdc14A en otros mecanismos de regulación. Se ha propuesto que el dominio carboxilo de Cdc14A determina su localización centrosomal y centromérica (Yuan et al., 2007). Mediante el uso de mutantes etiquetados con EGFP, hemos estudiado el posible papel de la fosforilación de Cdc14A en Ser⁴¹¹, Ser⁴⁵³ y Ser⁵⁴⁹ en el control de su localización a lo largo del ciclo celular. Tanto EGFP-Cdc14A S453A como EGFP-Cdc14A S411/549E se localizan igual que EGFP-Cdc14A wt a lo largo de interfase y mitosis, lo que sugiere que ninguno de los residuos mutados estaría implicado en la regulación de la localización de Cdc14A o, en todo caso, por sí solos no son capaces de alterarla. Para estudiar si la fosforilación podría afectar a la localización de Cdc14A a la entrada en mitosis, sería interesante analizar un mutante no fosforilable en los cinco sitios potenciales de fosforilación por CDKs en el dominio carboxilo. Quizás también podrían estudiarse estos mutantes no fosforilables en combinación con mutantes en otros residuos, ya que no podemos descartar que sean necesarios varios eventos de fosforilación por diversas quinasas para regular la localización de Cdc14A. Además, estos mutantes podrían compararse con una situación de hiperfosforilación como la producida por el tratamiento con OA, aunque en este caso la falta de adherencia de las células dificultaría el análisis por microscopía.

Finalmente, algunos de nuestros datos preliminares sugieren que habría diferencias entre la estabilidad de las proteínas activa e inactiva debidas a la autodesfosforilación, aunque este hecho necesita ser estudiado con más detalle.

En resumen, nuestros datos sobre la regulación de Cdc14A muestran que, al igual que sus homólogos en otros organismos, Cdc14A es una fosfoproteína y es sustrato de los complejos CDK (Wolfe et al., 2006; Kaiser et al., 2004). También comparte con otros

homólogos la capacidad de autodesfosforilación, aunque a diferencia de Flp1 en *S. pombe*, este mecanismo de autorregulación parece contribuir a disminuir la actividad de Cdc14A en lugar de activarla (Wolfe et al., 2006). Por otra parte, al igual que Kaiser y colaboradores (Kaiser et al., 2002), no hemos observado grandes oscilaciones en su actividad, si bien nuestros resultados sugieren que la fosforilación y autodesfosforilación de Cdc14A en mitosis serían inhibitoras en cierta medida de su actividad catalítica. No hay que olvidar que es probable que las fosforilaciones de otros residuos por otras quinasas también formen parte de estos mecanismos de regulación. Así pues, proponemos un modelo complejo en el que la fosforilación de Cdc14A en Ser⁴⁵³ por Cdk1-Ciclina B1 conllevaría una disminución de su actividad a la entrada en mitosis, al mismo tiempo que se incrementaría la fosforilación en Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹. Posteriormente, en la transición metafase-anafase, la fosforilación en Ser⁴⁵³ debe ser revertida para activar a la proteína, y Ser³⁵¹ y Ser³⁶³ deben fosforilarse por Plk1 (Modelo 2). Este balance entre fosforilaciones y desfosforilaciones en distintos residuos determinaría la actividad necesaria para que Cdc14A pudiera frenar la transición G2/M hasta que la célula esté lista para dividirse, su posterior inhibición para permitir la entrada en mitosis y su activación en la transición metafase-anafase para participar en la activación de Cdh1 durante la salida de mitosis.

Discusión



Modelo 2. Oscilaciones de la actividad de Cdc14A mediadas por fosforilación. Cdc14A es activa a lo largo de todo el ciclo celular. Durante interfase existiría un nivel basal de fosforilación en Ser⁴⁵³ y este nivel sería aún menor en Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹ debido a la propia autodesfosforilación de Cdc14A. Durante la transición G2/M, los complejos Cdk1-Ciclina B1 fosforilarían la Ser⁴⁵³ para reducir la actividad de Cdc14A y favorecer la entrada y progresión por las primeras fases de mitosis, y al mismo tiempo podrían fosforilar Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹, contrarrestando la autodesfosforilación de Cdc14A, para mantener un cierto nivel de actividad de la proteína. En el momento de la transición metafase-anafase, Cdc14A sería fosforilada por Plk1 en Ser³⁵¹ y Ser³⁶³ para activarse, al tiempo que comenzaría la desfosforilación de sus residuos CDK, sobre todo de Ser⁴⁵³. Este aumento de su actividad sería necesario para su participación en la activación de Cdh1 durante la salida de mitosis. La actividad de Cdc14A se representa con una línea roja. El tamaño de los grupos fosfato dibujados en cada caso sería representativo del nivel de fosforilación del residuo marcado en cada punto del ciclo. (?) indica que se desconoce con certeza si el residuo está fosforilado en ese punto del ciclo. P, PM, M, A, T = Profase, Prometáfase, Metafase, Anafase, Telofase.

CONCLUSIONES

1. La fosforilación de Wee1 en Ser¹³⁹ por los complejos CDK mitóticos regula su interacción con Plk1 y, como consecuencia, promueve su degradación a la entrada en mitosis.

2. La quinasa Wee1 es sustrato de la fosfatasa Cdc14A en células humanas. Cdc14A desfosforila a Wee1 en Ser¹²³ y Ser¹³⁹ para impedir su degradación en la transición G2/M.

3. Cdc14A es una fosfoproteína.
 - a. Cdc14A es sustrato de los complejos Cdk1-Ciclina B1 en mitosis.
 - b. Cdc14A se regula por autodesfosforilación de residuos fosforilados por CDKs.
 - c. La fosforilación por los complejos Cdk1-Ciclina B1 se produce principalmente sobre la Ser⁴⁵³ y también tiene lugar sobre los residuos Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹.
 - d. La fosforilación en Ser⁴⁵³ reduce la actividad catalítica de Cdc14A a la entrada en mitosis.
 - e. La autodesfosforilación en Ser⁴¹¹ y Ser⁵⁴⁹ está implicada en el mecanismo de autoinhibición de Cdc14A a lo largo del ciclo celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVO Y TRANSFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES HUMANAS

1.1 Líneas celulares empleadas

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

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	CARACTERÍSTICAS	MEDIO DE CULTIVO
U2OS	Osteosarcoma	p53 wt	DMEM + 10% FBS
U2OS-Myc-Cdc14 wt	Osteosarcoma	Expresión inducible de Myc-Cdc14A wt (Tet-Off)	DMEM + 10% FBS
U2OS-Myc-Cdc14(PD)	Osteosarcoma	Expresión inducible de Myc-Cdc14A (PD) (Tet-Off)	DMEM + 10% FBS
HEK293T	Riñón embrionario	293 con SV40-T insertado	DMEM + 10% FBS
BJ-TERT	Fibroblastos	Inmortalizadas con hTert	DMEM + 10% FBS
RPE	Epitelio Pigmentario de Retina	Inmortalizadas con hTert	DMEM + 10% FBS
RPE Cdc14A ^{-/-}	Epitelio Pigmentario de Retina	RPE carentes del exón 2 de Cdc14A (no se produce proteína o no es funcional)	DMEM + 10% FBS
HCT116 Cdc14B ^{flox/flox}	Carcinoma colorrectal	Depleción de Cdc14B tras infección con Cre recombinasa	McCoy's + 10% FBS

Tabla MM-1. Líneas celulares empleadas

1.2 Medios y condiciones de cultivo

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

Con el fin de evitar el sobrecrecimiento de las células, antes de que éstas alcanzasen un 100% de confluencia en la placa se realizaron pases cada 3 ó 4 días, empleando Tripsina-EDTA o Tryple (GIBCO Invitrogen), lo que comúnmente se

denomina “tripsinización”, para eliminar la adhesión de las células y así poder sembrar éstas a una menor confluencia en nuevas placas. El medio McCoy’s y los suplementos utilizados fueron de GIBCO Invitrogen. El medio DMEM utilizado procede de GIBCO Invitrogen o de Sigma.

La manipulación de estas células se realizó en condiciones de esterilidad, en campanas de flujo laminar y empleando materiales estériles para el contacto directo con el cultivo celular.

Condiciones de cultivo e inducción de los clones estables U2OS Myc-Cdc14A wt y U2OS Myc-Cdc14A(PD)

Estos clones estables de U2OS se mantuvieron del mismo modo que las otras líneas celulares, pero en este caso al medio de cultivo, DMEM ya complementado con FBS y con los antibióticos estreptomycin y penicilina, también se le añadieron geneticina a 400 µg/ml (G418, GIBCO Invitrogen), puromicina a 1 µg/ml (Sigma) y tetraciclina a 2 µg/ml (Sigma). Para inducir la sobreexpresión de las proteínas Myc-Cdc14A wt o Myc-Cdc14A(PD), estas células se incubaron en medio sin tetraciclina, tras haberlas lavado dos veces con el mismo medio (para eliminar completamente la tetraciclina presente).

1.3 Congelación y descongelación de las células

Las células se conservan a largo plazo en nitrógeno líquido (-180°C), para lo que han de congelarse siguiendo un protocolo específico en el que se emplea DMSO (*Dimetilsulfóxido*) con el fin de evitar que las células se dañen por la formación de cristales durante el proceso de congelación y evitar al máximo la muerte celular.

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

En el momento de su utilización, las células congeladas en N₂ líquido, se mantuvieron en hielo seco hasta su descongelación en un baño a 37°C, tras lo que se realizó un lavado con medio con 10% FBS y las células se resuspendieron en el mismo medio fresco (para eliminar todo el DMSO presente).

1.4 Sincronización de las células

1.4.1 Sincronización de las células en G1/S por doble tratamiento con timidina

La timidina es un análogo de nucleótido que produce la parada de la replicación del ADN, lo que permite sincronizar las células en G1/S.

Las células se sembraron en placas p100 (100 mm de diámetro) y una vez adheridas se les añadió medio de cultivo con timidina (Sigma) a una concentración de 2,5 mM. Durante el primer tratamiento o “bloqueo”, las células se mantuvieron en presencia de esa concentración de timidina durante 24 horas. Tras este tiempo, la timidina fue eliminada por medio de dos lavados con PBS y se añadió medio fresco sin timidina durante 12 horas, tiempo que denominamos de “liberación”, en el que las células progresan a lo largo del ciclo. A continuación, los cultivos celulares se volvieron a incubar en medio con timidina 2,5 mM durante otras 24 horas, lo que constituyó el segundo bloqueo. Una vez concluido este tratamiento, se tomaron muestras de células paradas en la transición G1/S (tiempo de 0 horas), y se llevó a cabo la “liberación” del resto de las células, eliminando la timidina del medio como se ha descrito (por medio de dos lavados), lo que permitió la posterior recogida de muestras a los distintos tiempos deseados a lo largo del ciclo celular.

1.4.2 Sincronización de las células en mitosis por tratamiento con nocodazol

El nocodazol es un agente químico que se une a la β -tubulina e inhibe la dinámica de los microtúbulos, impidiendo la correcta formación del huso mitótico, lo que induce una parada de las células previa a metafase.

Las células se sembraron en placas p100 y una vez adheridas se les añadió medio de cultivo con nocodazol (Sigma) a una concentración final de 50 ng/ml, durante 12-15 horas. Tras el tratamiento con nocodazol, seleccionamos las células mitóticas (redondeadas, no adheridas) sacudiendo las placas (*shake off*) y recogiendo el medio con las células no adheridas. Estas células mitóticas podían ser recogidas para su

procesamiento (muestra correspondiente a 0 horas) o incubadas en medio sin nocodazol (“liberación”) y recogidas a distintos tiempos para el estudio de la salida de mitosis.

1.5 Tratamiento de las células con otros reactivos

Tratamiento con MG132

Algunos cultivos celulares fueron sometidos a un tratamiento con el compuesto MG132, que inhibe el proteasoma (gran complejo proteasa). Este tratamiento permite comprobar si la reducción de los niveles de una determinada proteína se produce a consecuencia de su degradación por parte del proteasoma, en función de si dicha reducción se ve compensada al tratar las células con MG132 o no. El compuesto MG132 (Calbiochem) se añadió al medio de cultivo a una concentración final 20 μM y las células se incubaron en su presencia durante 6 horas.

Tratamiento con Cicloheximida (CHX)

La cicloheximida inhibe la síntesis proteica en organismos eucariotas bloqueando la elongación de la traducción a través de la inhibición de la peptidil transferasa del ribosoma 60S. Para impedir la síntesis de nuevas proteínas, se trataron los cultivos celulares con cicloheximida (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante distintos tiempos.

Tratamiento con Ácido Okadaico (OA)

El Ácido Okadaico (O4511, Sigma) es un inhibidor de las fosfatasa de la familia PP2A-*like*. La concentración empleada (0,5 μM) inhibe tanto a PP2A como a PP1, pero no a las demás fosfatasa de esta familia. El tratamiento con OA fue de 2 horas en todos los casos.

Tratamiento con inhibidores de CDKs

Para inhibir la actividad de los complejos CDK se utilizó Purvalanol A (selectivo para Cdk1) o RO-3306 (selectivo para Cdk1 y Cdk2), a concentración 10 μM durante distintos tiempos según el experimento.

1.6 Transfecciones transitorias con ADN o ARN

Puesto que la membrana plasmática de las células humanas constituye una barrera frente a la entrada de elementos, para que las células incorporen un ADN o ARN exógeno es necesario un vehículo que atraviese dicha membrana.

1.6.1 Transfección con ADN

De entre las distintas estrategias existentes, en nuestro estudio empleamos varios métodos de transfección de ADN, dependiendo de la línea celular. En el caso de las células HEK293T se utilizó el método del Fosfato Cálcico, que se basa en la obtención de un precipitado o agregado entre el CaCl_2 y el ADN en una solución salina de fosfatos, que será endocitado por las células. En este método, por cada placa p100 se utilizaron 200 μl de CaCl_2 0,25M y 2-8 μg de ADN, sobre los que se añaden gota a gota 200 μl de HEBS (0,28M NaCl, 0,05M HEPES, 1,5mM Na_2HPO_4 , pH 7-7.15) mientras se burbujea. Tras 2 minutos de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se añadió a las células. El medio se cambió tras 12 horas de transfección.

En el caso de las demás líneas utilizadas, se utilizó la lipofección, que permite la formación de pequeños liposomas que contienen el ADN que queremos introducir en la célula. La transfección se llevó a cabo empleando el reactivo comercial *Lipofectamine 2000* (GIBCO Invitrogen) según las instrucciones del fabricante.

Las células se sembraron 12-24 horas antes de la transfección, de forma que estuviesen a un 50% o 60% de confluencia en el momento de ésta.

1.6.2 Transfección con siRNAs

Con el fin de reducir los niveles de expresión de la proteína Cdc14A, empleamos ARNs pequeños de interferencia (siRNA). Este método permite el silenciamiento de genes de manera específica a nivel post-transcripcional, mediante pequeñas moléculas de ARN de doble cadena que se unen a la secuencia específica diana del mRNA.

En concreto, en nuestro estudio empleamos siRNA suministrados por Invitrogen frente a la proteína Cdc14A (secuencia diana: 5'-GGGACAUUGAUAGCCUGUUAUGUAA-3'). Utilizamos un siRNA diseñado frente a Luciferasa como control negativo (secuencia diana: 5'-NNACGUACGCGGAAUACUUCGAA-3').

La cantidad de siRNA transfectada fue de 60-100 nM en cultivos sembrados en placas p100, y la cantidad proporcional en placas de otros tamaños.

1.7 Infección con virus

1.7.1 Generación de líneas estables mediante infección con retrovirus

El procedimiento de infección consiste en un primer paso de co-transfección de células HEK293T con cada uno de los plásmidos de interés junto con el vector pCL-Anfo, que codifica para las proteínas de la envuelta del retrovirus (tabla MM-2). De esta manera, la maquinaria celular produce las proteínas víricas que se ensamblarán y darán lugar a retrovirus con capacidad infecciosa que contienen el plásmido de interés (tabla MM-3). Tras 36 horas de transfección, se añadió medio fresco a las células HEK293T, el cual se utilizó para infectar las células problema. Tras 12 horas, este medio se centrifugó (5 minutos a 1.500 r.p.m.), se filtró (filtros de 0,45µm), se le añadió polibreno (*hexadimethrine bromide*, 4 µg/ml) y se añadió a las células que se deseaba infectar. Este protocolo se repitió por segunda vez tras 12 horas. Al cumplirse 24 horas desde la primera infección, se retiró el medio de infección y se añadió medio fresco con el antibiótico de selección puromicina (0,5µg/ml), de manera que las células infectadas son resistentes a la droga mientras que las no infectadas mueren en un período de 3 a 6 días, dando como resultado cultivos estables en los que todas las células expresan la proteína de interés de manera constitutiva.

VECTOR RETROVIRAL	PROMOTOR	RESISTENCIA
pBabe-puro pBabe-HA pBabe-Flag	SV40-IEP (immediate-early promoter)	Puromicina
pLPCX	CMV (citomegalovirus)	Puromicina
pLIB-EGFP (control de transfección)	LTR (long terminal repeat)	
pCL-Ampho (empaquetamiento del virus) (gag/pol/env)	CMV (citomegalovirus)	

Tabla MM-2. Vectores retrovirales empleados para la generación de líneas estables.

PLÁSMIDOS EMPLEADOS PARA GENERAR LÍNEAS ESTABLES		
CONTROL	Wee1	Cdc14A
pBabe-empty	pBabe-HA-Wee1 wt	pBabe-Cdc14A wt
pLPCX-empty	pBabe-HA-Wee1 S123A	pBabe-Cdc14A(R)
	pBabe-HA-Wee1 S139A	pBabe-HA-Cdc14A wt
	pBabe-HA-Wee1 S123/139A	pBabe-HA-Cdc14A(PD)
	pBabe-HA-Wee1(KD)	pLPCX-Flag-Cdc14A wt
	pBabe-HA-Wee1(KD) S123A	pLPCX-Flag-Cdc14A S453A
	pBabe-HA-Wee1(KD) S139A	pLPCX-Flag-Cdc14A S411/549E
	pBabe-HA-Wee1(KD) S123/139A	pLPCX-Flag-Cdc14A S453A+S411/549E
		pLPCX-Flag-Cdc14A(PD)

Tabla MM-3. Plásmidos empleados para la generación de líneas estables U2OS o RPE que expresan Wee1 o Cdc14A.

1.7.2 Infección con adenovirus para deplecionar Cdc14B en células HCT116

Cdc14B^{flox/flox}

Las células HCT116 Cdc14B^{flox/flox} presentan el exón 2 de Cdc14B flanqueado por regiones loxP (Berdougo et al., 2008). Estas células se infectaron con adenovirus vacíos (como control) o conteniendo la Cre recombinasa (AdCre) para producir la escisión del exón 2 y evitar la transcripción de Cdc14B funcional. La cantidad de adenovirus utilizada fue de 300 partículas víricas por célula (*RAPAdTM System, Gene Transfer Vector Core, Universidad de Iowa*), siguiendo las especificaciones del fabricante. Tras 12 horas se retiró el medio de infección y se añadió medio fresco.

2. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.1 Construcción de plásmidos de ADN recombinante

Las construcciones generadas y empleadas en este trabajo se obtuvieron insertando secuencias de cADN (inserto) en los correspondientes vectores o plásmidos. Con estas construcciones se transformaron células competentes de *E. coli* (DH5 α), seleccionando las colonias transformantes con la resistencia asociada a cada vector (ampicilina o kanamicina). La confirmación de que las colonias contenían el plásmido

deseado se realizó mediante el aislamiento del ADN plasmídico a partir de esas células y su análisis con enzimas de restricción y electroforesis de los fragmentos de ADN obtenidos, y posteriormente, mediante la secuenciación de dicho ADN.

2.1.1 Aislamiento de ADN plasmídico a partir de células de *E. coli*

La obtención de ADN plasmídico a partir de *E. coli* a pequeña escala se llevó a cabo mediante el método de la lisis alcalina (Birnboim and Doly, 1979), conocido comúnmente como “Miniprep”. Para la obtención de ADN de calidad a gran escala (Maxiprep) se empleó el sistema comercial *JetStar Maxi* (Genomed) según las especificaciones del fabricante.

2.1.2 Determinación de la concentración de ácidos nucleicos

La concentración de ADN se determinó midiendo la absorbancia a $\lambda=260$ nm (en cubeta de cuarzo) en un espectrofotómetro U-2001 (Hitachi), y considerando la relación de absorbancia a $\lambda=260/280$ nm para estimar el grado de pureza de la preparación. Posteriormente, se corroboró esta concentración por medio del análisis de la fluorescencia emitida por la muestra tras la electroforesis en un gel de agarosa con bromuro de etidio.

2.1.3 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión con enzimas de restricción permite la caracterización física de fragmentos de ADN, por tanto, la comprobación de construcciones plasmídicas de ADN recombinante. Las enzimas de restricción y el ADN se incubaron a 37°C en el tampón adecuado, suministrado por el fabricante junto con las enzimas. Roche Diagnostics, Fermentas y New England Biolabs fueron las casas comerciales que suministraron las enzimas de restricción empleadas en este trabajo.

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

2.1.4 Electroforesis de fragmentos de ADN

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

2.1.5 Purificación y ligación de fragmentos de ADN

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

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

2.1.6 Transformación de *E. coli*

El método empleado para la transformación de *E. coli* (DH5α) competentes fue el descrito por Kurshner en 1978. Además, la transformación con plásmidos de las células competentes también se llevó a cabo siguiendo el protocolo de “transformación en un minuto” descrito por Golub en 1988. Las células transformadas se sembraron en una placa Petri con LB-agar que contenía el antibiótico de selección correspondiente (ampicilina 100µg/ml o kanamicina 200µg/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C. Una vez transformadas estas células, a partir de ellas se pudieron aislar mayores cantidades

de nuestras construcciones de ADN recombinante, que fueron comprobadas mediante digestión y secuenciación.

2.1.7 Reacciones de amplificación de ADN (PCR)

Las reacciones de amplificación de ADN o PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa) se realizaron en un termociclador *Minicycler* de Eppendorf. Las condiciones programadas fueron diferentes en función del tamaño de la secuencia a amplificar y de los oligonucleótidos utilizados. La PCR se llevó a cabo en presencia de los oligonucleótidos diseñados en cada caso, el ADN molde, los dNTPs (desoxinucleósido trifosfato) y la Taq polimerasa (una polimerasa termorresistente). Dependiendo de la finalidad del producto de PCR se utilizó la polimerasa *High Fidelity* de Roche Diagnostics, la Pfu de Stratagene o la polimerasa de Biotools. El resultado de la PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa, y los productos obtenidos se purificaron usando el sistema *Jet Quick PCR Product Purification Spin Kit* de Genomed.

A continuación se detalla la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la obtención de construcciones de ADN recombinante, su nombre y las aplicaciones para las que fueron diseñados.

- Las construcciones de Wee1 en pGEX-4T (expresión en bacteria), pCEFL-HA (expresión en células de mamífero) o pBabe (infección retroviral) se realizaron introduciendo secuencias reconocidas por las enzimas BamHI y EcoRI en los extremos 5' y 3' del gen.
- Las construcciones de Cdc14A en pGEX-4T (expresión en bacteria), pCEFL-Flag y pEGFP-N1 (expresión en células de mamífero), pBabe y pLPCX (infección retroviral), se realizaron introduciendo secuencias reconocidas por las enzimas EcoRI, NotI, Sall, XhoI o BamHI según el vector empleado.

Oligonucleótidos empleados para la mutagénesis del ORF (del inglés *Open Reading Frame*, marco de lectura abierta) de Wee1 y Cdc14A:

Wee1 S123A

5'-CTT CGG CTC CTC GGC GCC GGT CAA GTC G-3'

Wee1 S123A com

5'-CGA CTT GAC CGG CGC CGA GGA GCC GAA G-3'

Wee1 S139A

5'-GGT AGC TCT TTC GCG CCG GTG CGC TGC G-3'

Wee1 S139A com

5'-CGC AGC GCA CCG GCG CGA AAG AGC TAC C-3'

Wee1 K328R

5'-GCA TTT ATG CCA TTA GGC GAT CAA AAA AGC C-3'

Wee1 K328R com

5'-GGC TTT TTT GAT CGC CTA ATG GCA TAA ATG C-3'

- Oligonucleótidos empleados para la mutagénesis del ORF de Cdc14A:

Cdc14A S411A

5'-CAG CCA CGT ACC GCA CCA TCC TGT GCA TTT AG-3'

Cdc14A S411A com

5'-CTA AAT GCA CAG GAT GGT GCG GTA CGT GGC TG-3'

Cdc14A S453A

5'-CAA AAA TGG CAC TGG CCC CTT CAG CAA CG-3'

Cdc14A S453A com

5'-CGT TGC TGA AGG GGC CAG TGC CAT TTT TG-3'

Cdc14A S511A

5'-GGC TTC ACA GCC GCC CCG TTT ACC AAC-3'

Cdc14A S511A com

5'-GTT GGT AAA CGG GGC GGC TGT GAA GCC-3'

Cdc14A S549A

5'-CAG CCA CGT ACC GCA CCA TCC TGT GCA TTT AG-3'

Cdc14A S549A com

5'-GGG GGC CTG GGG GGG CGT TCA GGT TGC C-3'

Cdc14A T590A

5'-GTC AGT GCG CAG GCA CCA CCT CCT GGT C-3'

Cdc14A T590A com

5'-GAC CAG GCG GTG GTG CCT GCG CAC TTA C-3'

Cdc14A S411E

5'-CAG CCA CGT ACC GAG CCA TCC TG GCA-3'

Cdc14A S411E com

5'-TGC ACA GGA TGG CTC GGT ACG TGG CTG-3'

Cdc14A S549E

5'-GGC AAC CTG AAC GAG CCC CCA GGC CCC-3'

Cdc14A S549E com

5'-GGG GCC TGG GGG CTC GTT CAG GTT GCC-3'

- Numerosos oligonucleótidos (no detallados) fueron empleados para la comprobación de las construcciones obtenidas mediante secuenciación.

2.1.8 Secuenciación de ADN

Las construcciones de ADN recombinante obtenidas, en las que el inserto fue sometido a amplificación por la técnica de PCR, fueron comprobadas mediante secuenciación. La secuenciación de ADN se realizó de forma automática utilizando un secuenciador *ABI Prism 377* de Perkin-Elmer en el Servicio de Análisis Genómico del Centro de Investigación del Cáncer.

2.2 Análisis de mARN

La obtención del ARN total se realizó empleando el sistema *RNAspin Mini* (Amersham) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ARN se cuantificó utilizando un NanoDrop. La síntesis de cADN a partir de este ARN (1µg) se llevó a cabo con el sistema *SuperScript First-Strand Kit* (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. El análisis mediante RT-PCR se llevó a cabo usando el reactivo *iQTM SYBR[®] Green Supermix* (BioRad) con el *iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System* (Bio Rad), utilizando los siguientes oligonucleótidos:

Cdc14A

5'-GTT CCT GAA CAT CTG TGA-3'

5'-GCA TGT GTA AAC CTG TAG3'

Cdc14B

5'-GTG CCA TTG CAG TAC ATT-3'

5'-AGC AGG CTA TCA GAG TG-3'

18S rRNA (control)

5'-CGC CGC TAG AGG TGA AAT TC-3'

5'-CT TCG CTC TGG TCC GTC TT-3'

3. CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS)

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

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

Determinación del índice mitótico mediante citometría de flujo

El índice mitótico de un cultivo celular puede determinarse mediante la detección y cuantificación de las células positivas para la fosforilación en Ser¹⁰ de la histona H3 (pHH3), presente desde antefase hasta el final de mitosis. Para ello, las células se fijaron con etanol 70% como se ha explicado, y tras los lavados con PBS se permeabilizaron con PBS + 0,15% Tritón X-100 en hielo durante 5 minutos. Se lavaron dos veces con PBS mediante centrifugación para eliminar el Tritón X-100, a continuación las células se resuspendieron en 100µl de PBS + 0,5% BSA (albúmina sérica bovina) con 0,75µg del

anticuerpo frente a pH3 (06-570; Millipore) y se incubaron a temperatura ambiente durante 3h en agitación. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario FITC goat anti-rabbit (111-095-144, Jackson ImmunoResearch Laboratories) a una dilución 1:200 en PBS + 0,5% BSA. Tras esta incubación, se lavaron dos veces con PBS y se procedió a la incubación con yoduro de propidio y RNAsa como se detalló en el apartado anterior.

4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

4.1 Obtención de extractos proteicos totales

Para poder analizar las proteínas celulares es preciso tenerlas disueltas en un tampón de extracción. Existen diversos tipos de soluciones tampón para este fin, con mayor o menor concentración de detergentes en función de cada situación experimental.

Los extractos proteicos se obtuvieron directamente a partir de células en cultivo, que fueron lavadas con PBS frío y recogidas directamente en tampón de lisis; o bien, a partir de muestras de células que habían sido tripsinizadas, recogidas por centrifugación, lavadas, y congeladas en hielo seco y guardadas a 70 °C hasta su procesamiento.

En ambos casos, las células se mezclaron bien con el tampón de lisis (Tris-Cl 20 mM a pH 8, NaCl 150 mM, NP40 0,5%, DTT 1mM e inhibidores de proteasas y fosfatasas: ortovanadato sódico 1 mM, NaF 10 mM, β -Glicerofosfato 10mM, PMSF 1mM, aprotinina 10 μ g/ml, leupeptina 10 μ g/ml y pepstatina 2 μ g/ml) y se incubaron durante 15 minutos en hielo dando vortex frecuentemente. A continuación, estos extractos se centrifugaron durante 15 minutos a máxima velocidad para eliminar los restos celulares no solubles.

4.2 Valoración de la concentración de proteína de los extractos totales

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

4.3 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

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

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

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

En cada gel SDS-PAGE, cargamos cantidades de extracto proteico equivalentes de todas las muestras, entre 10 y 40 µg, dependiendo de la proteína a detectar y de la línea celular. También se cargaron marcadores de peso molecular, preteñidos (en caso de *Western blot*) o no (en caso de tinción con azul de Coomassie), de GIBCO Invitrogen. La electroforesis en una dimensión se llevó a cabo utilizando el sistema *Mini-Protean* de Bio Rad, en condiciones desnaturalizantes, debido al tampón de carrera empleado (Tris 25mM, glicina 200mM, SDS 0,5%).

Una vez finalizada la electroforesis, estos geles se podían fijar y teñir con azul de Coomassie, o bien ser sometidos a electrotransferencia e inmunodetección, por la técnica de *Western blot*.

4.4 Análisis de proteínas mediante *western blot*

Los geles SDS-PAGE se electrotransfirieron durante 1,5-2 horas a voltaje constante (100V) a una membrana de nitrocelulosa (*Hybond ECL* de Amersham), utilizando el sistema *Mini-Transblot* de Bio Rad. Empleamos como tampón de transferencia: CAPS

(ácido 3-(ciclohexil-amino)-1-propanesulfónico) 10 mM, etanol 10%, a pH 11). La eficiencia de la transferencia se comprobó tiñendo la membrana con el colorante Ponceau S (0,3% Ponceau S + 3% Ácido Tricloroacético).

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

La inmunodetección de proteínas consiste en su detección utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales (Tabla MM-4). Se utilizan dos anticuerpos, uno primario que reconoce específicamente a la proteína problema, y otro secundario que reconoce al anterior y está conjugado con una enzima, como la peroxidasa, que cataliza la reacción de detección. La incubación con el anticuerpo primario se llevó a cabo en la solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Tras esto, se lavó la membrana cuatro veces durante 5 minutos con una solución que contiene PBS con Tween-20 al 0,05%. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó también en solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente, y después, se lavó la membrana en PBS con Tween-20 al 0,05% dos veces durante 10 minutos y se llevó a cabo un último lavado sólo con PBS.

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
Anti-HA	1:1000	12CA5, Boheringer Mannheim
Anti-Myc	1:1000	9E10; Sigma-Aldrich
Anti-Flag	1:500	200474, Agilent Technologies
Anti-Wee1	1:500	sc-9037; Santa Cruz Biotechnology
Anti-pSer123(Wee1)	1:500	PAB0632; Abnova
Anti-pSer139(Wee1)	1:500	Este trabajo
Anti-Cdc14A	1:500	(N-18) sc-25952 ; Santa Cruz Biotechnology
Anti-Cdc14A	1:500	DCS-291; Neo Markers (descatalogado)
Anti-β-Actina	1:5000	AC-15; Sigma-Aldrich
Anti-Ciclina B1	1:1000	sc-752; Santa Cruz Biotechnology
Anti-Cdk1	1:1000	sc-54; Santa Cruz Biotechnology
Anti-pTyr15(Cdk1)	1:1000	9111; Cell Signaling
Anti-pSer10(HH3)	1:500	06-570; Millipore
Anti-Ciclina E	1:1000	sc-247, Santa Cruz Biotechnology
Anti-Cdc14B	1:500	34-8900, Invitrogen
Anti-pSer(CDKs)	1:500	2324; Cell Signaling (descatalogado)
Anti-Plk1	1:1000	33-1700; Zymed
Anti-Nek9	1:1000	Laboratorio del Dr. Joan Roig

ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
Anti-Ratón	1:2000	NA931 Amersham
Anti-Conejo	1:2000	NA934 Amersham
Anti-Cabra	1:2000	sc-2020, Santa Cruz Biotechnology
Anti-Rata	1:2000	NA935 Amersham

Tabla MM-4. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para la detección de proteínas mediante *western blot*.

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

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

4.5 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE con PhosTag™

El PhosTag™ (Phos-tag ACrylamide AAI-107, NARD Institute) es un compuesto que añadido a la mezcla de poliacrilamida junto con ClMn_2 se une a los grupos fosfato de las proteínas y retrasa la migración de las moléculas fosforiladas de manera dependiente de la cantidad de fosfatos. Para 5ml de gel de separación (poliacrilamida al 8%), se añaden: 1,7ml de H_2O , 1,3 ml de Tris pH 8 (1M), 1,3 ml de Protogel (EC-890, National Diagnostics), 50 μl de SDS 10%, 20 μl de PhosTag™, 80 μl de ClMn_2 (10mM), 50 μl de APS 10% y 5 μl de TEMED. Las muestras se corrieron durante 360 minutos a 100 V constantes en oscuridad y los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 840 minutos a 200mA constantes en un buffer apropiado (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y 200ml de metanol) a temperatura ambiente.

4.6 Tinción con azul de Coomassie

Tras la electroforesis, algunos geles de poliacrilamida se tiñeron con solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie al 0,5%, metanol al 20% y ácido acético 10%) durante 5 minutos en agitación a RT. A continuación se destiñeron en solución de destinción (metanol al 20% y ácido acético al 10%) en agitación a temperatura ambiente,

cambiando periódicamente dicha solución, hasta distinguir las bandas correspondientes a las proteínas de interés con nitidez.

5. GENERACIÓN DEL ANTICUERPO anti-pSer139(Wee1)

La purificación del anticuerpo fosfoespecífico pSer139(Wee1) se llevó a cabo con la colaboración del laboratorio del Dr. Atanasio Pandiella, bajo la supervisión de la Dra. Elena Díaz, en el laboratorio 15 del Centro de Investigación del Cáncer.

Para producir este anticuerpo, se inmunizaron conejos con el péptido sintético LGSSFpS¹³⁹PVRCG de Wee1. El anticuerpo anti-pSer139(Wee1) fue purificado del suero procedente de estos conejos por cromatografía de afinidad utilizando una columna con el péptido sintético conjugado.

6. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GST A PARTIR DE *E. coli*

La purificación de las proteínas de fusión con GST se realizó a partir de células de *E. coli* transformadas con un plásmido pGEX-KG o pGEX-4T que contiene el cADN de la proteína a purificar. Para ello, se empleó un cultivo de estas células de *E. coli* en LB con 100 µg/ml de ampicilina y posteriormente se indujo la síntesis de la proteína por medio de la incubación durante 4 horas a 37°C en presencia de IPTG (0,5 mM). Tras este tiempo, las células fueron recogidas por centrifugación (a 8000r.p.m. durante 10 minutos) y se resuspendieron en un tampón de lisis (PBS frío, Tritón X-100 al 1%, Lisozima 0,2 µg/ml, DTT 2 mM, y los inhibidores de proteasas PMSF 1mM, aprotinina 10 µg/ml y leupeptina 10 µg/ml). Tras la incubación de la suspensión celular durante 30 minutos a 4°C, ésta fue sonicada con el sonicador *Misonic XL2010*, y después se centrifugó a 30000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue incubado con bolas de Glutación-sefarosa (Amersham) durante 1 hora a 4°C y lavado 5 veces con PBS (al que se le añadieron inhibidores de proteasas). La pureza de la proteína se comprobó mediante electroforesis en SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie.

7. INMUNOPRECIPITACIÓN

Las inmunoprecipitaciones permiten purificar proteínas por su unión a un anticuerpo específico, formando inmunocomplejos. La purificación de estos

inmunocomplejos se realiza gracias a la utilización de la proteína A o la proteína G (unidas a una matriz magnética, *Dynabeads* de Invitrogen, o de *Sepharosa* de GE Healthcare), que presentan afinidad por la región constante de las cadenas de las inmunoglobulinas.

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

8. ENSATOS *IN VITRO*: ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD QUINASA Y/O FOSFATASA

8.1 Ensayos de fosforilación de Wee1 por los complejos Cdk1-Ciclina B1

La proteína GST-Wee1(KD) purificada de *E. coli* se incubó con dos unidades de los complejos Cdk1-Ciclina B1 (New England *Biolabs*), y con tampón quinasa (Tris 50mM pH 7,5, MgCl₂ 10mM, EGTA 1mM, DTT 1mM y ATP 50mM) en presencia de 1µCi de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP durante 15 minutos a 30°C.

8.2 Ensayos de desfosforilación de Wee1 por Cdc14A

Las reacciones quinasa descritas en el apartado anterior se pararon tras los tiempos indicados lavando con tampón fosfatasa (imidazol 50mM pH 7,5, NaCl 50 mM, EDTA 1mM e inhibidores de proteasas), y posteriormente se incubaron en este mismo tampón con GST-hCdc14A o GST-hCdc14A(PD) durante 40 minutos a 30°C. Las reacciones se pararon añadiendo tampón de carga (Tris-HCl pH 6'8 80mM, DTT 5mM, SDS 2%, glicerol 7,5%, EDTA 5mM, azul de bromofenol 0,002%). Hervimos las muestras durante 5 minutos a 100°C y las proteínas se separaron mediante electroforesis en SDS-PAGE. Se realizó la tinción del gel con azul de Coomassie y su posterior secado a 80°C durante 2 horas (*Gel Dryer* de Bio Rad). Los resultados se analizaron mediante autorradiografía en películas (*BioMax MR film* de Kodak) o en pantallas de revelado de *Phosphor-Imager* de Fuji en el aparato *Molecular Imager FX* de Bio Rad.

La intensidad de las bandas correspondiente a la autorradiografía se cuantificó con el programa *Quantity One* de Bio Rad.

8.3 Ensayos de actividad de Cdc14A sobre pNPP

Inmunoprecipitados de Cdc14A o sus mutantes procedentes de células U2OS o HEK293T se incubaron con pNPP (*p-Nitrophenyl Phosphate*) en tampón fosfatasa durante los tiempos indicados. Estas reacciones se llevaron a cabo en presencia de OA.

El pNPP es una molécula cuya hidrólisis gracias a la actividad fosfatasa genera p-nitrofenol, un compuesto con absorbancia a 405nm, lo que permite utilizar un espectrofotómetro para realizar medidas de una misma reacción a lo largo del tiempo. De esta manera, es posible cuantificar la actividad catalítica de la fosfatasa de interés, ya que a mayor actividad, mayor será la producción de p-nitrofenol y, por tanto, la absorbancia, lo que posibilita realizar una cinética de la misma, estudiando la actividad fosfatasa a tiempos cortos y/o largos.

Para determinar la actividad de Cdc14A, se realizó una regresión lineal de los datos normalizados frente a la cantidad de proteína, de manera que la cinética se ajustó a la ecuación de una recta y la pendiente de la misma se utilizó como valor indicativo de la velocidad de la reacción.

9. INMUNOCITOQUÍMICA

Este método nos permitió analizar la localización subcelular de EGFP-Cdc14A mediante su observación con microscopio de fluorescencia.

Las células se sembraron e incubaron sobre cubreobjetos tratados previamente con poli-L-Lisina (Sigma) para mejorar la adherencia. Tras 24 horas de transfección de EGFP-Cdc14A o sus mutantes, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído 4% en PBS, durante 10 minutos a RT en agitación suave. Tras esto, se realizaron tres lavados con PBS y la incubación con DAPI (2 µg/ml) en PBS durante 5 minutos, todo ello en oscuridad. Posteriormente, se lavaron con agua MilliQ los cubreobjetos y se montaron sobre los portaobjetos usando *SlowFade* (Invitrogen). Para la observación de las muestras se empleó un microscopio (Leica DM6000B) acoplado a una cámara (Hamamatsu ORCA-ER), la adquisición y procesamiento de las imágenes se realizó con el programa *Metamorph*.

10. ANÁLISIS PROTEÓMICOS

Inmunoprecipitados de Myc-Cdc14A procedentes de HEK293T se resolvieron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE de gradiente (6-15%). El gel se tiñó con nitrato de plata y las bandas correspondientes a Cdc14A se digirieron con tripsina para fragmentar la proteína en péptidos. Los péptidos se analizaron mediante SIMAC (*Sequential Elution from IMAC*) y MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*) para identificar los que se encontraban monofosforilados. Posteriormente, esos mismos péptidos se analizaron mediante LC-MS/MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*) para determinar los residuos concretos fosforilados y cuantificar su fosforilación. Estos análisis fueron llevados a cabo por el Servicio de Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

- Acquaviva, C., and J. Pines. 2006. The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C. *J Cell Sci.* 119:2401-2404.
- Alvarez-Fernandez, M., R. Sanchez-Martinez, B. Sanz-Castillo, P.P. Gan, M. Sanz-Flores, M. Trakala, M. Ruiz-Torres, T. Lorca, A. Castro, and M. Malumbres. 2013. Greatwall is essential to prevent mitotic collapse after nuclear envelope breakdown in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:17374-17379.
- Andreassen, P.R., F.B. Lacroix, E. Villa-Moruzzi, and R.L. Margolis. 1998. Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol.* 141:1207-1215.
- Atherton-Fessler, S., L.L. Parker, R.L. Geahlen, and H. Piwnica-Worms. 1993. Mechanisms of p34cdc2 regulation. *Mol Cell Biol.* 13:1675-1685.
- Ayad, N.G., S. Rankin, M. Murakami, J. Jebanathirajah, S. Gygi, and M.W. Kirschner. 2003. Tome-1, a trigger of mitotic entry, is degraded during G1 via the APC. *Cell.* 113:101-113.
- Azzam, R., S.L. Chen, W. Shou, A.S. Mah, G. Alexandru, K. Nasmyth, R.S. Annan, S.A. Carr, and R.J. Deshaies. 2004. Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus. *Science.* 305:516-519.
- Baldin, V., and B. Ducommun. 1995. Subcellular localisation of human wee1 kinase is regulated during the cell cycle. *J Cell Sci.* 108 (Pt 6):2425-2432.
- Baldin, V., N. Theis-Febvre, C. Benne, C. Froment, M. Cazales, O. Burlet-Schiltz, and B. Ducommun. 2003. PKB/Akt phosphorylates the CDC25B phosphatase and regulates its intracellular localisation. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization.* 95:547-554.
- Bardin, A.J., and A. Amon. 2001. Men and sin: what's the difference? *Nature reviews. Molecular cell biology.* 2:815-826.
- Bardin, A.J., R. Visintin, and A. Amon. 2000. A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus. *Cell.* 102:21-31.
- Barr, F.A., H.H. Sillje, and E.A. Nigg. 2004. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 5:429-440.
- Barriere, C., D. Santamaria, A. Cerqueira, J. Galan, A. Martin, S. Ortega, M. Malumbres, P. Dubus, and M. Barbacid. 2007. Mice thrive without Cdk4 and Cdk2. *Molecular oncology.* 1:72-83.
- Bassermann, F., D. Frescas, D. Guardavaccaro, L. Busino, A. Peschiaroli, and M. Pagano. 2008. The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. *Cell.* 134:256-267.
- Bayliss, R., T. Sardon, J. Ebert, D. Lindner, I. Vernos, and E. Conti. 2004. Determinants for Aurora-A activation and Aurora-B discrimination by TPX2. *Cell Cycle.* 3:404-407.
- Bayliss, R., T. Sardon, I. Vernos, and E. Conti. 2003. Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol Cell.* 12:851-862.
- Bembenek, J., J. Kang, C. Kurischko, B. Li, J.R. Raab, K.D. Belanger, F.C. Luca, and H. Yu. 2005. Crm1-mediated nuclear export of Cdc14 is required for the completion of cytokinesis in budding yeast. *Cell Cycle.* 4:961-971.
- Bembenek, J., and H. Yu. 2001. Regulation of the anaphase-promoting complex by the dual specificity phosphatase human Cdc14a. *J Biol Chem.* 276:48237-48242.
- Berdougo, E., M.V. Nachury, P.K. Jackson, and P.V. Jallepalli. 2008. The nucleolar phosphatase Cdc14B is dispensable for chromosome segregation and mitotic exit in human cells. *Cell Cycle.* 7:1184-1190.
- Berthet, C., K.D. Klarmann, M.B. Hilton, H.C. Suh, J.R. Keller, H. Kiyokawa, and P. Kaldis. 2006. Combined loss of Cdk2 and Cdk4 results in embryonic lethality and Rb hypophosphorylation. *Developmental cell.* 10:563-573.

Bibliografía

- Bertran, M.T., S. Sdelci, L. Regue, J. Avruch, C. Caelles, and J. Roig. 2011. Nek9 is a Plk1-activated kinase that controls early centrosome separation through Nek6/7 and Eg5. *EMBO J.* 30:2634-2647.
- Besson, A., S.F. Dowdy, and J.M. Roberts. 2008. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental cell.* 14:159-169.
- Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
- Bollen, M., W. Peti, M.J. Ragusa, and M. Beullens. 2010. The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends in biochemical sciences.* 35:450-458.
- Booher, R.N., P.S. Holman, and A. Fattaey. 1997. Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J Biol Chem.* 272:22300-22306.
- Boutros, R., C. Dozier, and B. Ducommun. 2006. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Current opinion in cell biology.* 18:185-191.
- Boutros, R., and B. Ducommun. 2008. Asymmetric localization of the CDC25B phosphatase to the mother centrosome during interphase. *Cell Cycle.* 7:401-406.
- Bremmer, S.C., H. Hall, J.S. Martinez, C.L. Eissler, T.H. Hinrichsen, S. Rossie, L.L. Parker, M.C. Hall, and H. Charbonneau. 2012. Cdc14 phosphatases preferentially dephosphorylate a subset of cyclin-dependent kinase (Cdk) sites containing phosphoserine. *J Biol Chem.* 287:1662-1669.
- Broadus, M.R., and K.L. Gould. 2012. Multiple protein kinases influence the redistribution of fission yeast Clp1/Cdc14 phosphatase upon genotoxic stress. *Mol Biol Cell.* 23:4118-4128.
- Burgess, A., S. Vigneron, E. Brioudes, J.C. Labbe, T. Lorca, and A. Castro. 2010. Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:12564-12569.
- Busino, L., M. Donzelli, M. Chiesa, D. Guardavaccaro, D. Ganoth, N.V. Dorrello, A. Hershko, M. Pagano, and G.F. Draetta. 2003. Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature.* 426:87-91.
- Carmena, M., S. Ruchaud, and W.C. Earnshaw. 2009. Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Current opinion in cell biology.* 21:796-805.
- Cazales, M., E. Schmitt, E. Montembault, C. Dozier, C. Prigent, and B. Ducommun. 2005. CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle.* 4:1233-1238.
- Ceulemans, H., and M. Bollen. 2004. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiological reviews.* 84:1-39.
- Clemente-Blanco, A., M. Mayan-Santos, D.A. Schneider, F. Machin, A. Jarmuz, H. Tschochner, and L. Aragon. 2009. Cdc14 inhibits transcription by RNA polymerase I during anaphase. *Nature.* 458:219-222.
- Clemente-Blanco, A., N. Sen, M. Mayan-Santos, M.P. Sacristan, B. Graham, A. Jarmuz, A. Giess, E. Webb, L. Game, D. Eick, A. Bueno, M. Merckenschlager, and L. Aragon. 2011. Cdc14 phosphatase promotes segregation of telomeres through repression of RNA polymerase II transcription. *Nat Cell Biol.* 13:1450-1456.
- Clifford, D.M., B.A. Wolfe, R.H. Roberts-Galbraith, W.H. McDonald, J.R. Yates, 3rd, and K.L. Gould. 2008. The Clp1/Cdc14 phosphatase contributes to the robustness of cytokinesis by association with anillin-related Mid1. *J Cell Biol.* 181:79-88.
- Crosio, C., G.M. Fimia, R. Loury, M. Kimura, Y. Okano, H. Zhou, S. Sen, C.D. Allis, and P. Sassone-Corsi. 2002. Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol.* 22:874-885.
- Cueille, N., E. Salimova, V. Esteban, M. Blanco, S. Moreno, A. Bueno, and V. Simanis. 2001. Flp1, a fission yeast orthologue of the s. cerevisiae CDC14 gene, is not required for cyclin degradation or rum1p stabilisation at the end of mitosis. *J Cell Sci.* 114:2649-2664.

- Cundell, M.J., R.N. Bastos, T. Zhang, J. Holder, U. Gruneberg, B. Novak, and F.A. Barr. 2013. The BEG (PP2A-B55/ENSA/Greatwall) pathway ensures cytokinesis follows chromosome separation. *Mol Cell*. 52:393-405.
- Chauhan, S., X. Zheng, Y.Y. Tan, B.H. Tay, S. Lim, B. Venkatesh, and P. Kaldis. 2012. Evolution of the Cdk-activator Speedy/RINGO in vertebrates. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 69:3835-3850.
- Chen, C.T., M.P. Peli-Gulli, V. Simanis, and D. McCollum. 2006. S. pombe FEAR protein orthologs are not required for release of Clp1/Flp1 phosphatase from the nucleolus during mitosis. *J Cell Sci*. 119:4462-4466.
- Chen, J.S., M.R. Broadus, J.R. McLean, A. Feoktistova, L. Ren, and K.L. Gould. 2013. Comprehensive proteomics analysis reveals new substrates and regulators of the fission yeast clp1/cdc14 phosphatase. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 12:1074-1086.
- Chen, J.S., L.X. Lu, M.D. Ohi, K.M. Creamer, C. English, J.F. Partridge, R. Ohi, and K.L. Gould. 2011. Cdk1 phosphorylation of the kinetochore protein Nsk1 prevents error-prone chromosome segregation. *J Cell Biol*. 195:583-593.
- Chen, M.S., C.E. Ryan, and H. Piwnica-Worms. 2003. Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol*. 23:7488-7497.
- Cheng, A., S. Gerry, P. Kaldis, and M.J. Solomon. 2005a. Biochemical characterization of Cdk2-Speedy/Ringo A2. *BMC biochemistry*. 6:19.
- Cheng, A., and M.J. Solomon. 2008. Speedy/Ringo C regulates S and G2 phase progression in human cells. *Cell Cycle*. 7:3037-3047.
- Cheng, A., W. Xiong, J.E. Ferrell, Jr., and M.J. Solomon. 2005b. Identification and comparative analysis of multiple mammalian Speedy/Ringo proteins. *Cell Cycle*. 4:155-165.
- Chiesa, M., M. Guillaumot, M.J. Bueno, and M. Malumbres. 2011. The Cdc14B phosphatase displays oncogenic activity mediated by the Ras-Mek signaling pathway. *Cell Cycle*. 10:1607-1617.
- Cho, H.P., Y. Liu, M. Gomez, J. Dunlap, M. Tyers, and Y. Wang. 2005. The dual-specificity phosphatase CDC14B bundles and stabilizes microtubules. *Mol Cell Biol*. 25:4541-4551.
- Choi, S.H., M.P. Peli-Gulli, I. McLeod, A. Sarkeshik, J.R. Yates, 3rd, V. Simanis, and D. McCollum. 2009. Phosphorylation state defines discrete roles for monopolin in chromosome attachment and spindle elongation. *Curr Biol*. 19:985-995.
- D'Amours, D., F. Stegmeier, and A. Amon. 2004. Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA. *Cell*. 117:455-469.
- Dalal, S.N., C.M. Schweitzer, J. Gan, and J.A. DeCaprio. 1999. Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site. *Mol Cell Biol*. 19:4465-4479.
- Davezac, N., V. Baldin, B. Gabrielli, A. Forrest, N. Theis-Febvre, M. Yashida, and B. Ducommun. 2000. Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization. *Oncogene*. 19:2179-2185.
- de Carcer, G., G. Manning, and M. Malumbres. 2011. From Plk1 to Plk5: functional evolution of polo-like kinases. *Cell Cycle*. 10:2255-2262.
- De Souza, C.P., K.A. Ellem, and B.G. Gabrielli. 2000. Centrosomal and cytoplasmic Cdc2/cyclin B1 activation precedes nuclear mitotic events. *Experimental cell research*. 257:11-21.
- Delaval, B., A. Ferrand, N. Conte, C. Larroque, D. Hernandez-Verdun, C. Prigent, and D. Birnbaum. 2004. Aurora B-TACC1 protein complex in cytokinesis. *Oncogene*. 23:4516-4522.
- Denu, J.M., and J.E. Dixon. 1998. Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Current opinion in chemical biology*. 2:633-641.
- Diaz-Cuervo, H., and A. Bueno. 2008. Cds1 controls the release of Cdc14-like phosphatase Flp1 from the nucleolus to drive full activation of the checkpoint response to replication stress in fission yeast. *Mol Biol Cell*. 19:2488-2499.
- Dinarina, A., P.G. Santamaria, and A.R. Nebreda. 2009. Cell cycle regulation of the mammalian CDK activator RINGO/Speedy A. *FEBS Lett*. 583:2772-2778.

Bibliografía

- Dominguez-Kelly, R., Y. Martin, S. Koundrioukoff, M.E. Tanenbaum, V.A. Smits, R.H. Medema, M. Debatisse, and R. Freire. 2011. Wee1 controls genomic stability during replication by regulating the Mus81-Eme1 endonuclease. *J Cell Biol.* 194:567-579.
- Donzelli, M., and G.F. Draetta. 2003. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep.* 4:671-677.
- Donzelli, M., M. Squatrito, D. Ganoth, A. Hershko, M. Pagano, and G.F. Draetta. 2002. Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase. *EMBO J.* 21:4875-4884.
- Dryden, S.C., F.A. Nahhas, J.E. Nowak, A.S. Goustin, and M.A. Tainsky. 2003. Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Mol Cell Biol.* 23:3173-3185.
- Ducruet, A.P., A. Vogt, P. Wipf, and J.S. Lazo. 2005. Dual specificity protein phosphatases: therapeutic targets for cancer and Alzheimer's disease. *Annual review of pharmacology and toxicology.* 45:725-750.
- Dutertre, S., M. Cazales, M. Quaranta, C. Froment, V. Trabut, C. Dozier, G. Mirey, J.P. Bouche, N. Theis-Febvre, E. Schmitt, B. Monsarrat, C. Prigent, and B. Ducommun. 2004. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci.* 117:2523-2531.
- Elia, A.E., P. Rellos, L.F. Haire, J.W. Chao, F.J. Ivins, K. Hoepker, D. Mohammad, L.C. Cantley, S.J. Smerdon, and M.B. Yaffe. 2003. The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell.* 115:83-95.
- Endicott, J.A., P. Nurse, and L.N. Johnson. 1994. Mutational analysis supports a structural model for the cell cycle protein kinase p34. *Protein engineering.* 7:243-253.
- Esteban, V., M. Blanco, N. Cueille, V. Simanis, S. Moreno, and A. Bueno. 2004. A role for the Cdc14-family phosphatase F1p1 at the end of the cell cycle in controlling the rapid degradation of the mitotic inducer Cdc25p in fission yeast. *J Cell Sci.* 117:2461-2468.
- Esteban, V., M.D. Vazquez-Novelle, E. Calvo, A. Bueno, and M.P. Sacristan. 2006. Human Cdc14A reverses CDK1 phosphorylation of Cdc25A on serines 115 and 320. *Cell Cycle.* 5:2894-2898.
- Evans, T., E.T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel, and T. Hunt. 1983. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell.* 33:389-396.
- Eymin, B., P. Claverie, C. Salon, C. Brambilla, E. Brambilla, and S. Gazzeri. 2006. p14ARF triggers G2 arrest through ERK-mediated Cdc25C phosphorylation, ubiquitination and proteasomal degradation. *Cell Cycle.* 5:759-765.
- Faust, A.M., C.C. Wong, J.R. Yates, 3rd, D.G. Drubin, and G. Barnes. 2013. The FEAR protein Slk19 restricts Cdc14 phosphatase to the nucleus until the end of anaphase, regulating its participation in mitotic exit in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* 8:e73194.
- Fu, C., J.J. Ward, I. Loiodice, G. Velve-Casquillas, F.J. Nedelec, and P.T. Tran. 2009. Phospho-regulated interaction between kinesin-6 Klp9p and microtubule bundler Ase1p promotes spindle elongation. *Developmental cell.* 17:257-267.
- Fu, J., M. Bian, Q. Jiang, and C. Zhang. 2007. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res.* 5:1-10.
- Fung, T.K., H.T. Ma, and R.Y. Poon. 2007. Specialized roles of the two mitotic cyclins in somatic cells: cyclin A as an activator of M phase-promoting factor. *Mol Biol Cell.* 18:1861-1873.
- Fung, T.K., and R.Y. Poon. 2005. A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Seminars in cell & developmental biology.* 16:335-342.
- Gabrielli, B.G., J.M. Clark, A.K. McCormack, and K.A. Ellem. 1997. Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of Cdc25 regulates activity toward cyclin B1/Cdc2 but not cyclin A/Cdk2. *J Biol Chem.* 272:28607-28614.
- Gabrielli, B.G., C.P. De Souza, I.D. Tonks, J.M. Clark, N.K. Hayward, and K.A. Ellem. 1996. Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. *J Cell Sci.* 109 (Pt 5):1081-1093.

- Garcia-Higuera, I., E. Manchado, P. Dubus, M. Canamero, J. Mendez, S. Moreno, and M. Malumbres. 2008. Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1. *Nat Cell Biol.* 10:802-811.
- Garner-Hamrick, P.A., and C. Fisher. 1998. Antisense phosphorothioate oligonucleotides specifically down-regulate cdc25B causing S-phase delay and persistent antiproliferative effects. *International journal of cancer. Journal international du cancer.* 76:720-728.
- Gavet, O., and J. Pines. 2010. Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J Cell Biol.* 189:247-259.
- Geley, S., E. Kramer, C. Gieffers, J. Gannon, J.M. Peters, and T. Hunt. 2001. Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol.* 153:137-148.
- Gerlich, D., B. Koch, F. Dupeux, J.M. Peters, and J. Ellenberg. 2006. Live-cell imaging reveals a stable cohesin-chromatin interaction after but not before DNA replication. *Curr Biol.* 16:1571-1578.
- Gharbi-Ayachi, A., J.C. Labbe, A. Burgess, S. Vigneron, J.M. Strub, E. Brioude, A. Van-Dorselaer, A. Castro, and T. Lorca. 2010. The substrate of Greatwall kinase, Arpp19, controls mitosis by inhibiting protein phosphatase 2A. *Science.* 330:1673-1677.
- Giet, R., and D.M. Glover. 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.* 152:669-682.
- Giles, N., A. Forrest, and B. Gabrielli. 2003. 14-3-3 acts as an intramolecular bridge to regulate cdc25B localization and activity. *J Biol Chem.* 278:28580-28587.
- Glover, D.M. 2012. The overlooked greatwall: a new perspective on mitotic control. *Open biology.* 2:120023.
- Goldstone, S., S. Pavey, A. Forrest, J. Sinnamon, and B. Gabrielli. 2001. Cdc25-dependent activation of cyclin A/cdk2 is blocked in G2 phase arrested cells independently of ATM/ATR. *Oncogene.* 20:921-932.
- Gong, D., J.R. Pomerening, J.W. Myers, C. Gustavsson, J.T. Jones, A.T. Hahn, T. Meyer, and J.E. Ferrell, Jr. 2007. Cyclin A2 regulates nuclear-envelope breakdown and the nuclear accumulation of cyclin B1. *Curr Biol.* 17:85-91.
- Gorr, I.H., D. Boos, and O. Stemmann. 2005. Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. *Mol Cell.* 19:135-141.
- Goto, H., Y. Yasui, A. Kawajiri, E.A. Nigg, Y. Terada, M. Tatsuka, K. Nagata, and M. Inagaki. 2003. Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J Biol Chem.* 278:8526-8530.
- Gray, C.H., V.M. Good, N.K. Tonks, and D. Barford. 2003. The structure of the cell cycle protein Cdc14 reveals a proline-directed protein phosphatase. *EMBO J.* 22:3524-3535.
- Gruneberg, U., R. Neef, R. Honda, E.A. Nigg, and F.A. Barr. 2004. Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. *J Cell Biol.* 166:167-172.
- Guillamot, M., E. Manchado, M. Chiesa, G. Gomez-Lopez, D.G. Pisano, M.P. Sacristan, and M. Malumbres. 2011. Cdc14b regulates mammalian RNA polymerase II and represses cell cycle transcription. *Scientific reports.* 1:189.
- Hagting, A., C. Karlsson, P. Clute, M. Jackman, and J. Pines. 1998. MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J.* 17:4127-4138.
- Hamanaka, R., S. Maloid, M.R. Smith, C.D. O'Connell, D.L. Longo, and D.K. Ferris. 1994. Cloning and characterization of human and murine homologues of the Drosophila polo serine-threonine kinase. *Cell Growth Differ.* 5:249-257.
- Hansen, C.A., J. Bartek, and S. Jensen. 2008. A functional link between the human cell cycle-regulatory phosphatase Cdc14A and the atypical mitogen-activated kinase Erk3. *Cell Cycle.* 7:325-334.
- Harper, J.W. 1997. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer surveys.* 29:91-107.

Bibliografia

- Hartwell, L.H., J. Culotti, J.R. Pringle, and B.J. Reid. 1974. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science*. 183:46-51.
- Heald, R., M. McLoughlin, and F. McKeon. 1993. Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. *Cell*. 74:463-474.
- Hegarati, N., C. Vesely, P.K. Vinod, C. Ocasio, N. Peter, J. Gannon, A.W. Oliver, B. Novak, and H. Hochegger. 2014. PP2A/B55 and Fcp1 regulate Greatwall and Ensa dephosphorylation during mitotic exit. *PLoS genetics*. 10:e1004004.
- Helps, N.R., X. Luo, H.M. Barker, and P.T. Cohen. 2000. NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem J*. 349:509-518.
- Higuchi, T., and F. Uhlmann. 2005. Stabilization of microtubule dynamics at anaphase onset promotes chromosome segregation. *Nature*. 433:171-176.
- Hirota, T., N. Kunitoku, T. Sasayama, T. Marumoto, D. Zhang, M. Nitta, K. Hatakeyama, and H. Saya. 2003. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell*. 114:585-598.
- Hoffmann, I., G. Draetta, and E. Karsenti. 1994. Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J*. 13:4302-4310.
- Holtrich, U., G. Wolf, A. Brauningner, T. Karn, B. Bohme, H. Rubsamen-Waigmann, and K. Strebhardt. 1994. Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:1736-1740.
- Hsu, J.Y., Z.W. Sun, X. Li, M. Reuben, K. Tatchell, D.K. Bishop, J.M. Grushcow, C.J. Brame, J.A. Caldwell, D.F. Hunt, R. Lin, M.M. Smith, and C.D. Allis. 2000. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*. 102:279-291.
- Inoue, T., M. Hiratsuka, M. Osaki, H. Yamada, I. Kishimoto, S. Yamaguchi, S. Nakano, M. Katoh, H. Ito, and M. Oshimura. 2007. SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. *Oncogene*. 26:945-957.
- Jackman, M., C. Lindon, E.A. Nigg, and J. Pines. 2003. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol*. 5:143-148.
- Jaspersen, S.L., J.F. Charles, and D.O. Morgan. 1999. Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol*. 9:227-236.
- Jaspersen, S.L., J.F. Charles, R.L. Tinker-Kulberg, and D.O. Morgan. 1998. A late mitotic regulatory network controlling cyclin destruction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 9:2803-2817.
- Jensen, S., M. Geymonat, and L.H. Johnston. 2002. Mitotic exit: delaying the end without FEAR. *Curr Biol*. 12:R221-223.
- Ji, M., S. Yang, Y. Chen, L. Xiao, L. Zhang, and J. Dong. 2012. Phospho-regulation of KIBRA by CDK1 and CDC14 phosphatase controls cell-cycle progression. *Biochem J*. 447:93-102.
- Kaiser, B.K., M.V. Nachury, B.E. Gardner, and P.K. Jackson. 2004. *Xenopus* Cdc14 alpha/beta are localized to the nucleolus and centrosome and are required for embryonic cell division. *BMC Cell Biol*. 5:27.
- Kaiser, B.K., Z.A. Zimmerman, H. Charbonneau, and P.K. Jackson. 2002. Disruption of centrosome structure, chromosome segregation, and cytokinesis by misexpression of human Cdc14A phosphatase. *Mol Biol Cell*. 13:2289-2300.
- Kallstrom, H., A. Lindqvist, V. Pospisil, A. Lundgren, and C.K. Rosenthal. 2005. Cdc25A localisation and shuttling: characterisation of sequences mediating nuclear export and import. *Experimental cell research*. 303:89-100.
- Karaiskou, A., L.H. Perez, I. Ferby, R. Ozon, C. Jesus, and A.R. Nebreda. 2001. Differential regulation of Cdc2 and Cdk2 by RINGO and cyclins. *J Biol Chem*. 276:36028-36034.

- Katayama, K., N. Fujita, and T. Tsuruo. 2005. Akt/protein kinase B-dependent phosphorylation and inactivation of WEE1Hu promote cell cycle progression at G2/M transition. *Mol Cell Biol.* 25:5725-5737.
- Kawajiri, A., Y. Yasui, H. Goto, M. Tatsuka, M. Takahashi, K. Nagata, and M. Inagaki. 2003. Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinatedly with Rho-kinase. *Mol Biol Cell.* 14:1489-1500.
- Khmelniskii, A., C. Lawrence, J. Roostalu, and E. Schiebel. 2007. Cdc14-regulated midzone assembly controls anaphase B. *J Cell Biol.* 177:981-993.
- Kieffer, I., C. Lorenzo, C. Dozier, E. Schmitt, and B. Ducommun. 2007. Differential mitotic degradation of the CDC25B phosphatase variants. *Oncogene.* 26:7847-7858.
- Kim, S.Y., E.J. Song, K.J. Lee, and J.E. Ferrell, Jr. 2005. Multisite M-phase phosphorylation of Xenopus Wee1A. *Mol Cell Biol.* 25:10580-10590.
- Kishi, K., M.A. van Vugt, K. Okamoto, Y. Hayashi, and M.B. Yaffe. 2009. Functional dynamics of Polo-like kinase 1 at the centrosome. *Mol Cell Biol.* 29:3134-3150.
- Kiyokawa, H., and D. Ray. 2008. In vivo roles of CDC25 phosphatases: biological insight into the anti-cancer therapeutic targets. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry.* 8:832-836.
- Kobayashi, H., E. Stewart, R. Poon, J.P. Adamczewski, J. Gannon, and T. Hunt. 1992. Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell.* 3:1279-1294.
- Kramer, A., N. Mailand, C. Lukas, R.G. Syljuasen, C.J. Wilkinson, E.A. Nigg, J. Bartek, and J. Lukas. 2004. Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat Cell Biol.* 6:884-891.
- Krasinska, L., G. de Bettignies, D. Fisher, A. Abrieu, D. Fesquet, and N. Morin. 2007. Regulation of multiple cell cycle events by Cdc14 homologues in vertebrates. *Experimental cell research.* 313:1225-1239.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lam, M.H., and J.M. Rosen. 2004. Chk1 versus Cdc25: checking one's levels of cellular proliferation. *Cell Cycle.* 3:1355-1357.
- Lammer, C., S. Wagerer, R. Saffrich, D. Mertens, W. Ansorge, and I. Hoffmann. 1998. The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J Cell Sci.* 111 (Pt 16):2445-2453.
- Larochelle, S., K.A. Merrick, M.E. Terret, L. Wohlbold, N.M. Barboza, C. Zhang, K.M. Shokat, P.V. Jallepalli, and R.P. Fisher. 2007. Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells. *Mol Cell.* 25:839-850.
- Lee, J., A. Kumagai, and W.G. Dunphy. 2001. Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins. *Mol Biol Cell.* 12:551-563.
- Lees, E. 1995. Cyclin dependent kinase regulation. *Current opinion in cell biology.* 7:773-780.
- Lees, E.M., and E. Harlow. 1993. Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol.* 13:1194-1201.
- Lemaire, M., C. Froment, R. Boutros, O. Mondesert, A.R. Nebreda, B. Monsarrat, and B. Ducommun. 2006. CDC25B phosphorylation by p38 and MK-2. *Cell Cycle.* 5:1649-1653.
- Li, C., M. Andrade, R. Dunbrack, and G.H. Enders. 2010. A bifunctional regulatory element in human somatic Wee1 mediates cyclin A/Cdk2 binding and Crm1-dependent nuclear export. *Mol Cell Biol.* 30:116-130.
- Li, L., B.R. Ernsting, M.J. Wishart, D.L. Lohse, and J.E. Dixon. 1997. A family of putative tumor suppressors is structurally and functionally conserved in humans and yeast. *J Biol Chem.* 272:29403-29406.
- Li, L., M. Ljungman, and J.E. Dixon. 2000. The human Cdc14 phosphatases interact with and dephosphorylate the tumor suppressor protein p53. *J Biol Chem.* 275:2410-2414.

Bibliografía

- Lim, H.H., and U. Surana. 2003. Tome-1, wee1, and the onset of mitosis: coupled destruction for timely entry. *Mol Cell*. 11:845-846.
- Lindon, C., and J. Pines. 2004. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J Cell Biol*. 164:233-241.
- Lindqvist, A., V. Rodriguez-Bravo, and R.H. Medema. 2009. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol*. 185:193-202.
- Lippincott, J., K.B. Shannon, W. Shou, R.J. Deshaies, and R. Li. 2001. The Tem1 small GTPase controls actomyosin and septin dynamics during cytokinesis. *J Cell Sci*. 114:1379-1386.
- Liu, F., J.J. Stanton, Z. Wu, and H. Piwnicka-Worms. 1997. The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol Cell Biol*. 17:571-583.
- Loffler, H., B. Rebacz, A.D. Ho, J. Lukas, J. Bartek, and A. Kramer. 2006. Chk1-dependent regulation of Cdc25B functions to coordinate mitotic events. *Cell Cycle*. 5:2543-2547.
- Lolli, G., and L.N. Johnson. 2005. CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle*. 4:572-577.
- Lowe, M., N.K. Gonatas, and G. Warren. 2000. The mitotic phosphorylation cycle of the cis-Golgi matrix protein GM130. *J Cell Biol*. 149:341-356.
- Lu, R., H. Niida, and M. Nakanishi. 2004. Human SAD1 kinase is involved in UV-induced DNA damage checkpoint function. *J Biol Chem*. 279:31164-31170.
- Lukas, C., C.S. Sorensen, E. Kramer, E. Santoni-Rugiu, C. Lindeneg, J.M. Peters, J. Bartek, and J. Lukas. 1999. Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature*. 401:815-818.
- Macurek, L., A. Lindqvist, D. Lim, M.A. Lampson, R. Klompaker, R. Freire, C. Clouin, S.S. Taylor, M.B. Yaffe, and R.H. Medema. 2008. Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature*. 455:119-123.
- Mahajan, K., B. Fang, J.M. Koomen, and N.P. Mahajan. 2012. H2B Tyr37 phosphorylation suppresses expression of replication-dependent core histone genes. *Nature structural & molecular biology*. 19:930-937.
- Mailand, N., C. Lukas, B.K. Kaiser, P.K. Jackson, J. Bartek, and J. Lukas. 2002a. Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation. *Nat Cell Biol*. 4:317-322.
- Mailand, N., A.V. Podtelejnikov, A. Groth, M. Mann, J. Bartek, and J. Lukas. 2002b. Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J*. 21:5911-5920.
- Malumbres, M., and M. Barbacid. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences*. 30:630-641.
- Malumbres, M., and M. Barbacid. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews. Cancer*. 9:153-166.
- Malumbres, M., R. Sotillo, D. Santamaria, J. Galan, A. Cerezo, S. Ortega, P. Dubus, and M. Barbacid. 2004. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell*. 118:493-504.
- Manchado, E., M. Guillamot, G. de Carcer, M. Eguren, M. Trickey, I. Garcia-Higuera, S. Moreno, H. Yamano, M. Canamero, and M. Malumbres. 2010. Targeting mitotic exit leads to tumor regression in vivo: Modulation by Cdk1, Mastl, and the PP2A/B55alpha,delta phosphatase. *Cancer Cell*. 18:641-654.
- Mardin, B.R., C. Lange, J.E. Baxter, T. Hardy, S.R. Scholz, A.M. Fry, and E. Schiebel. 2010. Components of the Hippo pathway cooperate with Nek2 kinase to regulate centrosome disjunction. *Nat Cell Biol*. 12:1166-1176.
- Marumoto, T., S. Honda, T. Hara, M. Nitta, T. Hirota, E. Kohmura, and H. Saya. 2003. Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J Biol Chem*. 278:51786-51795.

- McGowan, C.H., and P. Russell. 1993. Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J.* 12:75-85.
- McGowan, C.H., and P. Russell. 1995. Cell cycle regulation of human WEE1. *EMBO J.* 14:2166-2175.
- Meitinger, F., S. Palani, and G. Pereira. 2012. The power of MEN in cytokinesis. *Cell Cycle.* 11:219-228.
- Mhaweche, P. 2005. 14-3-3 proteins--an update. *Cell research.* 15:228-236.
- Mi, J., C. Guo, D.L. Brautigan, and J.M. Larner. 2007. Protein phosphatase-1alpha regulates centrosome splitting through Nek2. *Cancer Res.* 67:1082-1089.
- Minoshima, Y., T. Kawashima, K. Hirose, Y. Tonozuka, A. Kawajiri, Y.C. Bao, X. Deng, M. Tatsuka, S. Narumiya, W.S. May, Jr., T. Nosaka, K. Semba, T. Inoue, T. Satoh, M. Inagaki, and T. Kitamura. 2003. Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Developmental cell.* 4:549-560.
- Mishra, M., J. Karagiannis, M. Sevugan, P. Singh, and M.K. Balasubramanian. 2005. The 14-3-3 protein rad24p modulates function of the cdc14p family phosphatase clp1p/flp1p in fission yeast. *Curr Biol.* 15:1376-1383.
- Mitra, J., and G.H. Enders. 2004. Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells. *Oncogene.* 23:3361-3367.
- Mitra, J., G.H. Enders, J. Azizkhan-Clifford, and K.L. Lengel. 2006. Dual regulation of the anaphase promoting complex in human cells by cyclin A-Cdk2 and cyclin A-Cdk1 complexes. *Cell Cycle.* 5:661-666.
- Mocciaro, A., E. Berdugo, K. Zeng, E. Black, P. Vagnarelli, W. Earnshaw, D. Gillespie, P. Jallepalli, and E. Schiebel. 2010. Vertebrate cells genetically deficient for Cdc14A or Cdc14B retain DNA damage checkpoint proficiency but are impaired in DNA repair. *J Cell Biol.* 189:631-639.
- Mocciaro, A., and E. Schiebel. 2010. Cdc14: a highly conserved family of phosphatases with non-conserved functions? *J Cell Sci.* 123:2867-2876.
- Morgan, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature.* 374:131-134.
- Mori, D., Y. Yano, K. Toyo-oka, N. Yoshida, M. Yamada, M. Muramatsu, D. Zhang, H. Saya, Y.Y. Toyoshima, K. Kinoshita, A. Wynshaw-Boris, and S. Hirotsumi. 2007. NDEL1 phosphorylation by Aurora-A kinase is essential for centrosomal maturation, separation, and TACC3 recruitment. *Mol Cell Biol.* 27:352-367.
- Morrow, C.J., A. Tighe, V.L. Johnson, M.I. Scott, C. Ditchfield, and S.S. Taylor. 2005. Bub1 and aurora B cooperate to maintain BubR1-mediated inhibition of APC/CCdc20. *J Cell Sci.* 118:3639-3652.
- Mueller, P.R., T.R. Coleman, A. Kumagai, and W.G. Dunphy. 1995. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science.* 270:86-90.
- Murakami, M.S., T.D. Copeland, and G.F. Vande Woude. 1999. Mos positively regulates Xee-Wee1 to lengthen the first mitotic cell cycle of Xenopus. *Genes & development.* 13:620-631.
- Nakajima, H., F. Toyoshima-Morimoto, E. Taniguchi, and E. Nishida. 2003. Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *J Biol Chem.* 278:25277-25280.
- Nalepa, G., and J.W. Harper. 2004. Visualization of a highly organized intranuclear network of filaments in living mammalian cells. *Cell motility and the cytoskeleton.* 59:94-108.
- Nebreda, A.R. 2006. CDK activation by non-cyclin proteins. *Current opinion in cell biology.* 18:192-198.
- Nguyen, H.G., D. Chinnappan, T. Urano, and K. Ravid. 2005. Mechanism of Aurora-B degradation and its dependency on intact KEN and A-boxes: identification of an aneuploidy-promoting property. *Mol Cell Biol.* 25:4977-4992.
- Nilsson, I., and I. Hoffmann. 2000. Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res.* 4:107-114.

Bibliografia

- Nishiyama, T., R. Ladurner, J. Schmitz, E. Kreidl, A. Schleiffer, V. Bhaskara, M. Bando, K. Shirahige, A.A. Hyman, K. Mechtler, and J.M. Peters. 2010. Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. *Cell*. 143:737-749.
- North, B.J., and E. Verdin. 2007. Mitotic regulation of SIRT2 by cyclin-dependent kinase 1-dependent phosphorylation. *J Biol Chem*. 282:19546-19555.
- O'Regan, L., J. Blot, and A.M. Fry. 2007. Mitotic regulation by NIMA-related kinases. *Cell Div*. 2:25.
- O'Regan, L., and A.M. Fry. 2009. The Nek6 and Nek7 protein kinases are required for robust mitotic spindle formation and cytokinesis. *Mol Cell Biol*. 29:3975-3990.
- Okamoto, K., and N. Sagata. 2007. Mechanism for inactivation of the mitotic inhibitory kinase Wee1 at M phase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:3753-3758.
- Oliveira, R.A., and K. Nasmyth. 2010. Getting through anaphase: splitting the sisters and beyond. *Biochem Soc Trans*. 38:1639-1644.
- Olsen, B.B., J.N. Kreutzer, N. Watanabe, T. Holm, and B. Guerra. 2010. Mapping of the interaction sites between Wee1 kinase and the regulatory beta-subunit of protein kinase CK2. *Int J Oncol*. 36:1175-1182.
- Ovejero, S., P. Ayala, A. Bueno, and M.P. Sacristan. 2012. Human Cdc14A regulates Wee1 stability by counteracting CDK-mediated phosphorylation. *Mol Biol Cell*. 23:4515-4525.
- Owens, L., S. Simanski, C. Squire, A. Smith, J. Cartzendafner, V. Cavett, J. Caldwell Busby, T. Sato, and N.G. Ayad. 2010. Activation domain-dependent degradation of somatic Wee1 kinase. *J Biol Chem*. 285:6761-6769.
- Palani, S., F. Meitinger, M.E. Boehm, W.D. Lehmann, and G. Pereira. 2012. Cdc14-dependent dephosphorylation of Inn1 contributes to Inn1-Cyk3 complex formation. *J Cell Sci*. 125:3091-3096.
- Parker, L.L., S. Atherton-Fessler, and H. Piwnica-Worms. 1992. p107wee1 is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:2917-2921.
- Parker, L.L., and H. Piwnica-Worms. 1992. Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science*. 257:1955-1957.
- Parker, L.L., P.J. Sylvestre, M.J. Byrnes, 3rd, F. Liu, and H. Piwnica-Worms. 1995. Identification of a 95-kDa WEE1-like tyrosine kinase in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:9638-9642.
- Paulsen, M.T., A.M. Starks, F.A. Derheimer, S. Hanasoge, L. Li, J.E. Dixon, and M. Ljungman. 2006. The p53-targeting human phosphatase hCdc14A interacts with the Cdk1/cyclin B complex and is differentially expressed in human cancers. *Mol Cancer*. 5:25.
- Pavletich, N.P. 1999. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *Journal of molecular biology*. 287:821-828.
- Peddibhotla, S., Z. Wei, R. Papineni, M.H. Lam, J.M. Rosen, and P. Zhang. 2011. The DNA damage effector Chk1 kinase regulates Cdc14B nucleolar shuttling during cell cycle progression. *Cell Cycle*. 10:671-679.
- Penas, C., V. Ramachandran, S. Simanski, C. Lee, F. Madoux, R.J. Rahaim, R. Chauhan, O. Barnaby, S. Schurer, P. Hodder, J. Steen, W.R. Roush, and N.G. Ayad. 2014. Casein Kinase 1delta-dependent Wee1 Protein Degradation. *J Biol Chem*. 289:18893-18903.
- Petermann, E., M. Woodcock, and T. Helleday. 2010. Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:16090-16095.
- Petronczki, M., M. Glotzer, N. Kraut, and J.M. Peters. 2007. Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle. *Developmental cell*. 12:713-725.
- Petronczki, M., P. Lenart, and J.M. Peters. 2008. Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Developmental cell*. 14:646-659.
- Pines, J. 2011. Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 12:427-438.

- Pines, J., and T. Hunter. 1994. The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J.* 13:3772-3781.
- Pines, J., and C.L. Rieder. 2001. Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol.* 3:E3-6.
- Potapova, T.A., S. Sivakumar, J.N. Flynn, R. Li, and G.J. Gorbsky. 2011. Mitotic progression becomes irreversible in prometaphase and collapses when Wee1 and Cdc25 are inhibited. *Mol Biol Cell.* 22:1191-1206.
- Raj, K., P. Ogston, and P. Beard. 2001. Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity. *Nature.* 412:914-917.
- Reed, S.I., J. Ferguson, and J.C. Groppe. 1982. Preliminary characterization of the transcriptional and translational products of the *Saccharomyces cerevisiae* cell division cycle gene CDC28. *Mol Cell Biol.* 2:412-425.
- Reed, S.I., J.A. Hadwiger, and A.T. Lorincz. 1985. Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene CDC28. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:4055-4059.
- Richards, M.W., L. O'Regan, C. Mas-Droux, J.M. Blot, J. Cheung, S. Hoelder, A.M. Fry, and R. Bayliss. 2009. An autoinhibitory tyrosine motif in the cell-cycle-regulated Nek7 kinase is released through binding of Nek9. *Mol Cell.* 36:560-570.
- Rodier, G., P. Coulombe, P.L. Tanguay, C. Boutonnet, and S. Meloche. 2008. Phosphorylation of Skp2 regulated by CDK2 and Cdc14B protects it from degradation by APC(Cdh1) in G1 phase. *EMBO J.* 27:679-691.
- Roig, J., A. Mikhailov, C. Belham, and J. Avruch. 2002. Nercc1, a mammalian NIMA-family kinase, binds the Ran GTPase and regulates mitotic progression. *Genes & development.* 16:1640-1658.
- Roshak, A.K., E.A. Capper, C. Imburgia, J. Fornwald, G. Scott, and L.A. Marshall. 2000. The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cellular signalling.* 12:405-411.
- Rosso, L., A.C. Marques, M. Weier, N. Lambert, M.A. Lambot, P. Vanderhaeghen, and H. Kaessmann. 2008. Birth and rapid subcellular adaptation of a hominoid-specific CDC14 protein. *PLoS biology.* 6:e140.
- Rothblum-Oviatt, C.J., C.E. Ryan, and H. Piwnicka-Worms. 2001. 14-3-3 binding regulates catalytic activity of human Wee1 kinase. *Cell Growth Differ.* 12:581-589.
- Santamaria, D., C. Barriere, A. Cerqueira, S. Hunt, C. Tardy, K. Newton, J.F. Caceres, P. Dubus, M. Malumbres, and M. Barbacid. 2007. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature.* 448:811-815.
- Saunders, W. 2005. Centrosomal amplification and spindle multipolarity in cancer cells. *Seminars in cancer biology.* 15:25-32.
- Scolnick, D.M., and T.D. Halazonetis. 2000. Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature.* 406:430-435.
- Schindler, K., and R.M. Schultz. 2009a. The CDC14A phosphatase regulates oocyte maturation in mouse. *Cell Cycle.* 8:1090-1098.
- Schindler, K., and R.M. Schultz. 2009b. CDC14B acts through FZR1 (CDH1) to prevent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod.* 80:795-803.
- Schmitt, E., R. Boutros, C. Froment, B. Monsarrat, B. Ducommun, and C. Dozier. 2006. CHK1 phosphorylates CDC25B during the cell cycle in the absence of DNA damage. *J Cell Sci.* 119:4269-4275.
- Schmitz, M.H., M. Held, V. Janssens, J.R. Hutchins, O. Hudecz, E. Ivanova, J. Goris, L. Trinkle-Mulcahy, A.I. Lamond, I. Poser, A.A. Hyman, K. Mechtler, J.M. Peters, and D.W. Gerlich. 2010. Live-cell imaging RNAi screen identifies PP2A-B55alpha and importin-beta1 as key mitotic exit regulators in human cells. *Nat Cell Biol.* 12:886-893.

Bibliografia

- Sdelci, S., M. Schutz, R. Pinyol, M.T. Bertran, L. Regue, C. Caelles, I. Vernos, and J. Roig. 2012. Nek9 phosphorylation of NEDD1/GCP-WD contributes to Plk1 control of gamma-tubulin recruitment to the mitotic centrosome. *Curr Biol.* 22:1516-1523.
- Seki, A., J.A. Coppinger, C.Y. Jang, J.R. Yates, and G. Fang. 2008. Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science.* 320:1655-1658.
- Severson, A.F., D.R. Hamill, J.C. Carter, J. Schumacher, and B. Bowerman. 2000. The aurora-related kinase AIR-2 recruits ZEN-4/CeMKLP1 to the mitotic spindle at metaphase and is required for cytokinesis. *Curr Biol.* 10:1162-1171.
- Sherr, C.J., and J.M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development.* 13:1501-1512.
- Shou, W., J.H. Seol, A. Shevchenko, C. Baskerville, D. Moazed, Z.W. Chen, J. Jang, A. Shevchenko, H. Charbonneau, and R.J. Deshaies. 1999. Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell.* 97:233-244.
- Simanis, V. 2003. The mitotic exit and septation initiation networks. *J Cell Sci.* 116:4261-4262.
- Simanis, V., and P. Nurse. 1986. The cell cycle control gene *cdc2+* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell.* 45:261-268.
- Skoufias, D.A., R.L. Indorato, F. Lacroix, A. Panopoulos, and R.L. Margolis. 2007. Mitosis persists in the absence of Cdk1 activity when proteolysis or protein phosphatase activity is suppressed. *J Cell Biol.* 179:671-685.
- Smith, A., S. Simanski, M. Fallahi, and N.G. Ayad. 2007. Redundant ubiquitin ligase activities regulate *wee1* degradation and mitotic entry. *Cell Cycle.* 6:2795-2799.
- Smits, V.A., and R.H. Medema. 2001. Checking out the G(2)/M transition. *Biochim Biophys Acta.* 1519:1-12.
- Solomon, M.J., T. Lee, and M.W. Kirschner. 1992. Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol Biol Cell.* 3:13-27.
- Sorensen, C.S., R.G. Syljuasen, J. Falck, T. Schroeder, L. Ronnstrand, K.K. Khanna, B.B. Zhou, J. Bartek, and J. Lukas. 2003. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell.* 3:247-258.
- St Clair, S., L. Giono, S. Varmeh-Ziaie, L. Resnick-Silverman, W.J. Liu, A. Padi, J. Dastidar, A. DaCosta, M. Mattia, and J.J. Manfredi. 2004. DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the *cdc25C* promoter. *Mol Cell.* 16:725-736.
- Stegmeier, F., and A. Amon. 2004. Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annual review of genetics.* 38:203-232.
- Stegmeier, F., R. Visintin, and A. Amon. 2002. Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. *Cell.* 108:207-220.
- Strausfeld, U., J.C. Labbe, D. Fesquet, J.C. Cavadore, A. Picard, K. Sadhu, P. Russell, and M. Doree. 1991. Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature.* 351:242-245.
- Sullivan, M., T. Higuchi, V.L. Katis, and F. Uhlmann. 2004. Cdc14 phosphatase induces rDNA condensation and resolves cohesin-independent cohesion during budding yeast anaphase. *Cell.* 117:471-482.
- Sullivan, M., and D.O. Morgan. 2007. Finishing mitosis, one step at a time. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 8:894-903.
- Tanguay, P.L., G. Rodier, and S. Meloche. 2010. C-terminal domain phosphorylation of ERK3 controlled by Cdk1 and Cdc14 regulates its stability in mitosis. *Biochem J.* 428:103-111.

- Timofeev, O., O. Cizmecioglu, F. Settele, T. Kempf, and I. Hoffmann. 2010. Cdc25 phosphatases are required for timely assembly of CDK1-cyclin B at the G2/M transition. *J Biol Chem.* 285:16978-16990.
- Tominaga, Y., C. Li, R.H. Wang, and C.X. Deng. 2006. Murine Wee1 plays a critical role in cell cycle regulation and pre-implantation stages of embryonic development. *International journal of biological sciences.* 2:161-170.
- Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi, and E. Nishida. 2002. Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep.* 3:341-348.
- Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi, N. Shinya, A. Iwamatsu, and E. Nishida. 2001. Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature.* 410:215-220.
- Toyoshima, F., T. Moriguchi, A. Wada, M. Fukuda, and E. Nishida. 1998. Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *EMBO J.* 17:2728-2735.
- Trautmann, S., S. Rajagopalan, and D. McCollum. 2004. The *S. pombe* Cdc14-like phosphatase Clp1p regulates chromosome biorientation and interacts with Aurora kinase. *Developmental cell.* 7:755-762.
- Trautmann, S., B.A. Wolfe, P. Jorgensen, M. Tyers, K.L. Gould, and D. McCollum. 2001. Fission yeast Clp1p phosphatase regulates G2/M transition and coordination of cytokinesis with cell cycle progression. *Curr Biol.* 11:931-940.
- Trinkle-Mulcahy, L., J. Andersen, Y.W. Lam, G. Moorhead, M. Mann, and A.I. Lamond. 2006. Repo-Man recruits PP1 gamma to chromatin and is essential for cell viability. *J Cell Biol.* 172:679-692.
- Trinkle-Mulcahy, L., and A.I. Lamond. 2006. Mitotic phosphatases: no longer silent partners. *Current opinion in cell biology.* 18:623-631.
- Turowski, P., C. Franckhauser, M.C. Morris, P. Vaglio, A. Fernandez, and N.J. Lamb. 2003. Functional cdc25C dual-specificity phosphatase is required for S-phase entry in human cells. *Mol Biol Cell.* 14:2984-2998.
- Uhlmann, F., C. Bouchoux, and S. Lopez-Aviles. 2011. A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: revisited. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences.* 366:3572-3583.
- Uto, K., D. Inoue, K. Shimuta, N. Nakajo, and N. Sagata. 2004. Chk1, but not Chk2, inhibits Cdc25 phosphatases by a novel common mechanism. *EMBO J.* 23:3386-3396.
- Vagnarelli, P., and W.C. Earnshaw. 2004. Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma.* 113:211-222.
- Van Hooser, A., D.W. Goodrich, C.D. Allis, B.R. Brinkley, and M.A. Mancini. 1998. Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J Cell Sci.* 111 (Pt 23):3497-3506.
- van Leuken, R., L. Clijsters, W. van Zon, D. Lim, X. Yao, R.M. Wolthuis, M.B. Yaffe, R.H. Medema, and M.A. van Vugt. 2009. Polo-like kinase-1 controls Aurora A destruction by activating APC/C-Cdh1. *PLoS One.* 4:e5282.
- van Leuken, R., L. Clijsters, and R. Wolthuis. 2008. To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim Biophys Acta.* 1786:49-59.
- van Vugt, M.A., and R.H. Medema. 2005. Polo-like kinase-1: activity measurement and RNAi-mediated knockdown. *Methods Mol Biol.* 296:355-369.
- Vazquez-Novelle, M.D., V. Esteban, A. Bueno, and M.P. Sacristan. 2005. Functional homology among human and fission yeast Cdc14 phosphatases. *J Biol Chem.* 280:29144-29150.
- Vazquez-Novelle, M.D., N. Mailand, S. Ovejero, A. Bueno, and M.P. Sacristan. 2010. Human Cdc14A phosphatase modulates the G2/M transition through Cdc25A and Cdc25B. *J Biol Chem.* 285:40544-40553.
- Vigneron, S., E. Brioudes, A. Burgess, J.C. Labbe, T. Lorca, and A. Castro. 2009. Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A. *EMBO J.* 28:2786-2793.

Bibliografía

- Vigneron, S., S. Prieto, C. Bernis, J.C. Labbe, A. Castro, and T. Lorca. 2004. Kinetochores localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? *Mol Biol Cell*. 15:4584-4596.
- Visconti, R., L. Palazzo, R. Della Monica, and D. Grieco. 2012. Fcp1-dependent dephosphorylation is required for M-phase-promoting factor inactivation at mitosis exit. *Nature communications*. 3:894.
- Visintin, R., K. Craig, E.S. Hwang, S. Prinz, M. Tyers, and A. Amon. 1998. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell*. 2:709-718.
- Voets, E., and R.M. Wolthuis. 2010. MASTL is the human orthologue of Greatwall kinase that facilitates mitotic entry, anaphase and cytokinesis. *Cell Cycle*. 9:3591-3601.
- Walczak, C.E., and S.L. Shaw. 2010. A MAP for bundling microtubules. *Cell*. 142:364-367.
- Wang, R., G. He, M. Nelman-Gonzalez, C.L. Ashorn, G.E. Gallick, P.T. Stukenberg, M.W. Kirschner, and J. Kuang. 2007. Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition. *Cell*. 128:1119-1132.
- Wang, Y., C. Jacobs, K.E. Hook, H. Duan, R.N. Booher, and Y. Sun. 2000. Binding of 14-3-3beta to the carboxyl terminus of Wee1 increases Wee1 stability, kinase activity, and G2-M cell population. *Cell Growth Differ*. 11:211-219.
- Watanabe, N., H. Arai, J. Iwasaki, M. Shiina, K. Ogata, T. Hunter, and H. Osada. 2005. Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:11663-11668.
- Watanabe, N., H. Arai, Y. Nishihara, M. Taniguchi, T. Hunter, and H. Osada. 2004. M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:4419-4424.
- Watanabe, N., M. Broome, and T. Hunter. 1995. Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J*. 14:1878-1891.
- Wei, Z., S. Peddibhotla, H. Lin, X. Fang, M. Li, J.M. Rosen, and P. Zhang. 2011. Early-onset aging and defective DNA damage response in Cdc14b-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 31:1470-1477.
- White-Cooper, H., M. Carmena, C. Gonzalez, and D.M. Glover. 1996. Mutations in new cell cycle genes that fail to complement a multiply mutant third chromosome of *Drosophila*. *Genetics*. 144:1097-1111.
- Wolf, F., C. Wandke, N. Isenberg, and S. Geley. 2006. Dose-dependent effects of stable cyclin B1 on progression through mitosis in human cells. *EMBO J*. 25:2802-2813.
- Wolfe, B.A., and K.L. Gould. 2004. Inactivating Cdc25, mitotic style. *Cell Cycle*. 3:601-603.
- Wolfe, B.A., W.H. McDonald, J.R. Yates, 3rd, and K.L. Gould. 2006. Phospho-regulation of the Cdc14/Clp1 phosphatase delays late mitotic events in *S. pombe*. *Developmental cell*. 11:423-430.
- Wong, A.K., Y. Chen, L. Lian, P.C. Ha, K. Petersen, K. Laity, A. Carillo, M. Emerson, K. Heichman, J. Gupte, S.V. Tavtigian, and D.H. Teng. 1999. Genomic structure, chromosomal location, and mutation analysis of the human CDC14A gene. *Genomics*. 59:248-251.
- Wu, J., H.P. Cho, D.B. Rhee, D.K. Johnson, J. Dunlap, Y. Liu, and Y. Wang. 2008. Cdc14B depletion leads to centriole amplification, and its overexpression prevents unscheduled centriole duplication. *J Cell Biol*. 181:475-483.
- Wu, S., W. Wang, X. Kong, L.M. Congdon, K. Yokomori, M.W. Kirschner, and J.C. Rice. 2010. Dynamic regulation of the PR-Set7 histone methyltransferase is required for normal cell cycle progression. *Genes & development*. 24:2531-2542.
- Wurzenberger, C., and D.W. Gerlich. 2011. Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 12:469-482.
- Yamashiro, S., Y. Yamakita, G. Totsukawa, H. Goto, K. Kaibuchi, M. Ito, D.J. Hartshorne, and F. Matsumura. 2008. Myosin phosphatase-targeting subunit 1 regulates mitosis by antagonizing polo-like kinase 1. *Developmental cell*. 14:787-797.

- Yan, Y., C.P. Black, and K.H. Cowan. 2007. Irradiation-induced G2/M checkpoint response requires ERK1/2 activation. *Oncogene*. 26:4689-4698.
- Yang, J., E.S. Bardes, J.D. Moore, J. Brennan, M.A. Powers, and S. Kornbluth. 1998. Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes & development*. 12:2131-2143.
- Yu, H. 2007. Cdc20: a WD40 activator for a cell cycle degradation machine. *Mol Cell*. 27:3-16.
- Yu, J., S.L. Fleming, B. Williams, E.V. Williams, Z. Li, P. Somma, C.L. Rieder, and M.L. Goldberg. 2004. Greatwall kinase: a nuclear protein required for proper chromosome condensation and mitotic progression in *Drosophila*. *J Cell Biol*. 164:487-492.
- Yuan, K., H. Hu, Z. Guo, G. Fu, A.P. Shaw, R. Hu, and X. Yao. 2007. Phospho-regulation of HsCdc14A By Polo-like kinase 1 is essential for mitotic progression. *J Biol Chem*. 282:27414-27423.
- Zhao, B., M.J. Bower, P.J. McDevitt, H. Zhao, S.T. Davis, K.O. Johanson, S.M. Green, N.O. Concha, and B.B. Zhou. 2002. Structural basis for Chk1 inhibition by UCN-01. *J Biol Chem*. 277:46609-46615.

AGRADECIMIENTOS

Soy de esas personas que suelen dejar lo que más les gusta para el final, ese último trozo de chocolate que me deja un regusto dulce independientemente de lo que haya comido antes. De igual manera, he dejado para el final el momento más placentero de esta tesis, el de concluir el trabajo de 6 años y dar las gracias a todos los que han hecho posible que llegara al final de esta etapa.

Cómo no, quiero empezar por dar las gracias a María y Avelino por acogerme entre los Buenos, por todo lo que me habéis enseñado y por la confianza depositada a lo largo de todo este tiempo. Gracias a mis Churris. A Sonix, por ser una gran vecina de poyata, por todos esos buenos ratos de risas y desahogos, echaré de menos compartir frontera contigo. A Patri, porque sin tu ayuda no hubiera conseguido tanto, sabes que esto también es un poco tuyo. Gracias por el apoyo técnico, las largas horas en cultivos y las conversaciones saltarinas de tema en tema a cuál más surrealista, estos años han sido más fáciles gracias a ti. A Vane, por ser un encanto, por tu bondad y tu compañía dentro y fuera del labo, por tus consejos que me han cambiado la vida, por saber escuchar como nadie y por unirme a mis planes con una sonrisa por absurdos que pareciesen. Sabéis que tenéis casa allí donde vaya a parar. Gracias a los que ya no están, en especial a Laura, porque sin ti no sé si hubiera superado el duro comienzo de este camino. A Pilar, por tu bondad y tu eterna sonrisa. A Sandra, por tus enseñanzas y esas dosis de realidad tan necesarias. A Janine, por los buenos momentos fuera del lab y por dejarte convencer para “esas cosas tan frikis”. Gracias también a mis padawans. A Bea, porque eres un sol y tu presencia siempre es motivo de alegría. Y a Amalia, por descubrirme un Nuevo Mundo plagado de palabras en boricua y galletas de guayaba, *panas forever!*

Gracias también a los de fuera del L5. A Irene, por las cantidades ingentes de reactivos, ideas y consejos dados siempre con una sonrisa. A Elena Díaz, por tu inestimable ayuda para hacer anticuerpos. A todos aquellos laboratorios en los que me recibieron con una sonrisa cada vez que entré diciendo “Vengo a pedir” y me proporcionaron toda la ayuda posible. A los servicios de Proteómica, Secuenciación, Microscopía, Citometría, Mantenimiento, Informática, Cocina y Almacén por todo lo que han aportado a este trabajo y por hacernos el día a día más fácil. A Paco, por aguantar mis quejas de última hora del día y conseguir que me fuera a casa con una sonrisa. A Carlos, por ser mi postdoc particular, por tu inmensa sabiduría científica y ese sentido del humor contagioso tan tuyo. A Dani, por el apoyo y la comprensión entre becarios precarios. A David, por las largas conversaciones sobre la vida, la ciencia y el mundo en

general. A Nacho, por aguantar mis quejas estos últimos meses y por toda la ayuda prestada, reactivos, análisis de datos y juramentos en arameo incluidos. Merci à l'équipe Lorca-Castro de Montpellier, pour m'avoir accueillie; je me suis sentie intégrée à l'équipe depuis le premier moment. Merci à tous! Merci Sophie pour ton sense de l'humour. Gracias a Anna por los buenos consejos y los tirones de orejas. A Jorge, por tres meses de momentos paranormales que me alegraron la vida. To Khaled, my best discovery in France, for your unconditional support in every possible way. Grazie Cvi, per la tua contagiosa gioia di vivere, chi trova una amica italiana trova un tesoro.

Gracias a la gente a la que veo poco pero de la que me acuerdo mucho. A María, por ser mi *twisted sister* a lo largo de dos décadas, me siento inmensamente afortunada de tenerte; no hace falta que te explique lo muchísimo que eres para mí porque lo sabes de sobra. A Pili, por ser lo mejor que me ha dado Charrolandia, por tu apoyo incondicional, tu compañía, nuestras conversaciones y viajes, por confiar en mí y dejar que confíe en ti. A Miri, por el apoyo a lo largo de tantísimos años. A Irene, porque aunque no nos veamos a menudo contigo siempre siento que no ha pasado el tiempo. A Nacho, por esas conversaciones sobre becarios y tesis que darían para escribir muchos libros. Y a la gente que me ha acompañado en algún momento del camino, mis compañeros de Bioquímica, de italiano, de alemán, de tardes frikis, de bailes y pinchos, gracias por aguantarme y hacerme olvidar a ratos mis preocupaciones científicas, es necesario tener a alguien que de vez en cuando te haga levantar la vista del *western* para que te des cuenta de que hay vida más allá de tus membranas.

Gracias a mi familia en general y a mis padres en particular. Gracias, papá y mamá, por el apoyo moral y logístico, por vuestra ayuda y por las oportunidades que me habéis dado, todo es más fácil cuando sabes que tienes a alguien que te quiere y no te abandonará. Gracias Enrique, por resolver mis millones de dudas técnicas, por tu generosidad y por hacerme sentir orgullosa de ser tu hermana. A Mar, por tu sabiduría y apoyo, y porque admiro tu capacidad para lograrlo todo. Por último, gracias a mi abuela, ojalá hubieras podido ver esto terminado. Gracias por haber sido la mejor inspiración posible, el mejor ejemplo a seguir en voluntad, esfuerzo y dedicación, por tu amor incondicional y tu espíritu de superación. Te echo muchísimo de menos.

Human Cdc14A regulates Wee1 stability by counteracting CDK-mediated phosphorylation

Sara Ovejero, Patricia Ayala, Avelino Bueno, and María P. Sacristán

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer and Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca/Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 37007 Salamanca, Spain

ABSTRACT The activity of Cdk1–cyclin B1 mitotic complexes is regulated by the balance between the counteracting activities of Wee1/Myt1 kinases and Cdc25 phosphatases. These kinases and phosphatases must be strictly regulated to ensure proper mitotic timing. One masterpiece of this regulatory network is Cdk1, which promotes Cdc25 activity and suppresses inhibitory Wee1/Myt1 kinases through direct phosphorylation. The Cdk1-dependent phosphorylation of Wee1 primes phosphorylation by additional kinases such as Plk1, triggering Wee1 degradation at the onset of mitosis. Here we report that Cdc14A plays an important role in the regulation of Wee1 stability. Depletion of Cdc14A results in a significant reduction in Wee1 protein levels. Cdc14A binds to Wee1 at its amino-terminal domain and reverses CDK-mediated Wee1 phosphorylation. In particular, we found that Cdc14A inhibits Wee1 degradation through the dephosphorylation of Ser-123 and Ser-139 residues. Thus the lack of phosphorylation of these two residues prevents the interaction with Plk1 and the consequent efficient Wee1 degradation at the onset of mitosis. These data support the hypothesis that Cdc14A counteracts Cdk1–cyclin B1 activity through Wee1 dephosphorylation.

Monitoring Editor

Francis A. Barr
University of Liverpool

Received: Apr 4, 2012

Revised: Sep 27, 2012

Accepted: Oct 1, 2012

INTRODUCTION

The regulation of mitotic entry is critical in cell cycle control. In higher eukaryotes, the activation of Cdk1–cyclin B1 complexes, which is subject to strict control, drives the major events of mitosis. During the S and G2 phases, B-type cyclins accumulate, bind to Cdk1, and promote phosphorylation on three regulatory sites of Cdk1: Thr-14, Tyr-15 and Thr-161. The phosphorylation of Cdk1 on Thr-161 is required for maximal kinase activity, whereas phosphorylation on Thr-14 and Tyr-15 inhibits the enzymatic activity of Cdk1. In vertebrate cells, the Wee1 and Myt1 kinases are responsible for these inhibitory modifications, in which Wee1 appears to be dominant (McGowan and Russell, 1995; Mueller *et al.*, 1995a,b; Perry and Kornbluth, 2007). The activation of Cdk1 is achieved by

dephosphorylation of these two residues by Cdc25 phosphatases (Nilsson and Hoffmann, 2000). An important mechanism that tips the balance toward Cdc25 phosphatase activity to allow entry into mitosis is the down-regulation of Wee1/Myt1 kinases. Wee1 activity rises during the S and G2 phases of the cell cycle and declines at the G2/M transition, when high Cdk1 activity is required. In human cells, Wee1 is down-regulated primarily through proteasome-dependent degradation after phosphorylation by multiple kinases, among which Cdk1 is present (Mueller *et al.*, 1995a,b; Watanabe *et al.*, 2004, 2005). Cdk1 phosphorylates Wee1 on Ser-123, which primes additional phosphorylation by other kinases, leading to the formation of phosphodegrons responsible for SCF (Skp1/cullin/F-box) ubiquitin-mediated degradation of Wee1 (Watanabe *et al.*, 2005). Two different F-box proteins, β -TrCP and Tome-1 ubiquitin ligases, contribute directly to Wee1 destruction (Ayad *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2007). Other regions of Wee1 are also involved in its degradation. Thus the Wee1 activation domain, through phosphorylation at the Ser-472 residue, has been implicated in an efficient turnover of Wee1 (Owens *et al.*, 2010). Cdk2, bound to cyclin A, could well be the kinase responsible for this phosphorylation (Owens *et al.*, 2010). In other organisms, such as fission yeast and *Xenopus*, phosphorylation events inhibit the catalytic activity of Wee1 (Mueller *et al.*, 1995a; Parker *et al.*, 1993; Wu and Russell, 1993). In particular, *Xenopus*

This article was published online ahead of print in MBcC in Press (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E12-04-0260>) on October 10, 2012.

Address correspondence to: María P. Sacristán (msacristan@usal.es).

Abbreviations used: CDK, cyclin-dependent kinase; GST, glutathione S-transferase; HA, hemagglutinin; KD, kinase dead; λ PP, lambda protein phosphatase; PD, phosphatase dead; SCF, Skp1/cullin/F-box complex.

© 2012 Ovejero *et al.* This article is distributed by The American Society for Cell Biology under license from the author(s). Two months after publication it is available to the public under an Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>). “ASCB,” “The American Society for Cell Biology,” and “Molecular Biology of the Cell” are registered trademarks of The American Society of Cell Biology.

Wee1 can be phosphorylated and inhibited by Cdk1 in vitro (Mueller *et al.*, 1995a). However, the phosphorylation of human Wee1 by Cdk1 does not inhibit its kinase activity in vitro (Watanabe *et al.*, 1995). More recently, studies carried out in *Xenopus* suggested a probably conserved mechanism for Wee1 inactivation in which specific phosphorylation by Cdk1 at the well-conserved N-terminal region, called the Wee-box, induces Wee1 inactivation through binding with the *cis/trans* prolyl isomerase Pin1 (Okamoto and Sagata, 2007). In addition, other phosphorylation events carried out by different kinases are also involved in human Wee1 inactivation. Thus it was suggested that Akt promotes the G2/M transition by phosphorylation-dependent 14-3-3 binding and the cytoplasmic localization of Wee1 (Katayama *et al.*, 2005). Moreover, Cdk2–cyclin A also contributes to Wee1 nuclear export through binding to a conserved RXL motif and probably phosphorylation on the Thr-239 residue (Li *et al.*, 2010). Although export of Wee1 to the cytoplasm does not seem to be essential for entry into mitosis, it might be needed to prevent early activation of Cdk1–cyclin B1 complexes on centrosomes (Jackman *et al.*, 2003). Therefore multiple mechanisms seem to be involved in the inhibition of human Wee1 at entry into mitosis.

The highly conserved Cdc14 family of dual-specificity phosphatases reverses CDK-dependent phosphorylation events. In *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc14 is essential for the inactivation of mitotic Cdk and mitotic exit by reversing phosphorylation of many Cdk substrates (Stegmeier and Amon, 2004; Queralt and Uhlmann, 2008). In *Schizosaccharomyces pombe*, the Cdc14 homologue Flp1/Clp1 inhibits mitotic Cdk activity by promoting, at least in part, the down-regulation of Cdc25 protein through its direct dephosphorylation (Esteban *et al.*, 2004, 2008; Wolfe and Gould, 2004). It was also suggested that Flp1 is required for efficient DNA-damage response (Díaz-Cuervo and Bueno, 2008).

Cdc14 homologues also exist in metazoans. In mammals, there are two Cdc14 homologues, Cdc14A and Cdc14B, whose functions and substrates are poorly known. The two homologues are able to rescue Cdc14-deficient yeast cells, suggesting that some functions are conserved (Li *et al.*, 1997; Vázquez-Novelle *et al.*, 2005). However, their participation in the dephosphorylation of mitotic Cdk substrates at the exit of mitosis is not clear. Cdc14A, located at the centrosome during interphase, was implicated in the regulation of the centrosome cycle (Kaiser *et al.*, 2002; Mailand *et al.*, 2002). Moreover, Cdc14A phosphatase prevents premature entry into mitosis by inhibiting Cdc25 activity (Vázquez-Novelle *et al.*, 2010; Sacristán *et al.*, 2011). Cdc14B seems to be involved in many functions during the cell cycle (Mocciaro and Schiebel, 2010) and is able to promote malignant transformation in vitro (Chiesa *et al.*, 2011). It has also been suggested that both Cdc14A and Cdc14B phosphatases play a role in DNA repair (Berdougo *et al.*, 2008; Mocciaro *et al.*, 2010). Recent studies show that Cdc14 phosphatases regulate transcription during the cell cycle through the dephosphorylation of RNA polymerase II. This function is conserved in yeast and mammals (Clemente-Blanco *et al.*, 2011; Guillamot *et al.*, 2011). Here we identify a new Cdc14 substrate: the Wee1 kinase. Depletion of Cdc14A results in the degradation of Wee1 in human cells. This effect correlates with the ability of Cdc14A to reverse Cdk-mediated phosphorylation of Wee1 at Ser-123, a site known to be involved in Wee1 regulation, and Ser-139, a newly identified site phosphorylated by Cdks and also involved in the control of Wee1 stability. Given that Wee1 kinase is a crucial part of the regulatory network controlling Cdk1 activity, our data suggest that Cdc14A interferes with Cdk1 activity through Wee1 regulation.

RESULTS

Down-regulation of Cdc14A results in decreased Wee1 protein levels

The cooperative phosphorylation of Wee1 by Cdk1 and other kinases stimulates its degradation at the onset of mitosis to allow the G2/M transition (Watanabe *et al.*, 2004, 2005). On the basis of the finding that depletion of Cdc14A accelerates entry into mitosis (Vázquez-Novelle *et al.*, 2010) and that Cdc14 phosphatases reverse CDK phosphorylation, we wondered whether Cdc14A might regulate Wee1 kinase directly. To check this possibility, we first analyzed the levels of Wee1 in cells depleted for Cdc14A. U-2-OS cells were transfected with already validated Cdc14A small interfering RNAs (siRNAs; Vázquez-Novelle *et al.*, 2010), and Wee1 was examined at different time points after transfection. As shown in Figure 1A, after 48 h of siRNA Cdc14A treatment the cells showed a reduction in Wee1 protein levels. Consistent with this result, the phosphorylation of Cdk1 at Tyr15 was also reduced at this time point (Figure 1A). Treatment of cells with the proteasome inhibitor MG132 abolished the reduction in Wee1 protein levels (Figure 1B), suggesting that Cdc14A regulates Wee1 degradation. To evaluate siRNA duplex specificity, we performed rescue experiments with a siRNA-resistant Cdc14A construct. In U-2-OS cells infected with empty vector or with retrovirus expressing wild-type (wt) Cdc14A, transfection with siRNA Cdc14A induced the already observed reduction in Wee1 protein level as compared with siRNA control cells (Figure 1C, lanes 5 and 6 and lanes 11 and 12, respectively). However, this effect was significantly reversed by expression of siRNA-resistant Cdc14A (Figure 1C, lanes 17 and 18). Reduction in the levels of Wee1 kinase was also observed in nontransformed human BJ-TERT fibroblasts after transfection with Cdc14A siRNAs (Supplemental Figure S1). We also analyzed the effect of Cdc14A down-regulation on Wee1 protein levels at the G2/M transition. As shown in Figure 1D, the degradation of Wee1 started earlier and was increased in cells depleted for Cdc14A as compared with control cells, suggesting that Cdc14A regulates Wee1 at the G2/M transition.

Ectopic expression of Cdc14 phosphatases results in the dephosphorylation of Wee1

To investigate Wee1 regulation by Cdc14A, we next analyzed Wee1 in cells with high levels of Cdc14A phosphatase. We used U-2-OS clones conditionally expressing Myc-tagged Cdc14A or its phosphatase-dead (PD) mutant form (Mailand *et al.*, 2002). After the ectopic expression of active Cdc14A, but not of Cdc14A(PD), a striking change in the gel mobility of Wee1, detected as a faster-migrating form, was observed (Figure 2A). The treatment of Wee1, immunoprecipitated from both Cdc14A-overproducing and control cells, with λ phosphatase indicated that the observed change in the Wee1 electrophoretic mobility corresponded to the dephosphorylated forms of the protein (Figure 2B). However, overexpression of Cdc14A did not affect other Cdk1 substrates, such as the centrosomal Nek9 mitotic kinase (Bertran *et al.*, 2011), nor did it cause an indiscriminate effect on all Cdk phosphoepitopes (Supplemental Figure S2), suggesting that the effect on Wee1 is specific. The dephosphorylation and accumulation of Wee1 were also observed when Cdc14A was overexpressed at the G2/M transition (Figure 2C). This effect was correlated, as already reported, with cells accumulating in G2 as consequence of high levels of Cdc14A (Figure 2C; Vázquez-Novelle *et al.*, 2010). The dephosphorylation of Wee1 was also observed in HCT116 or HEK293T cells transiently transfected with active Cdc14A phosphatase (Supplemental Figure S3A). Moreover, the ectopic expression of Cdc14B, but not of PTEN or Cdc25 dual-specificity phosphatases, also resulted in Wee1

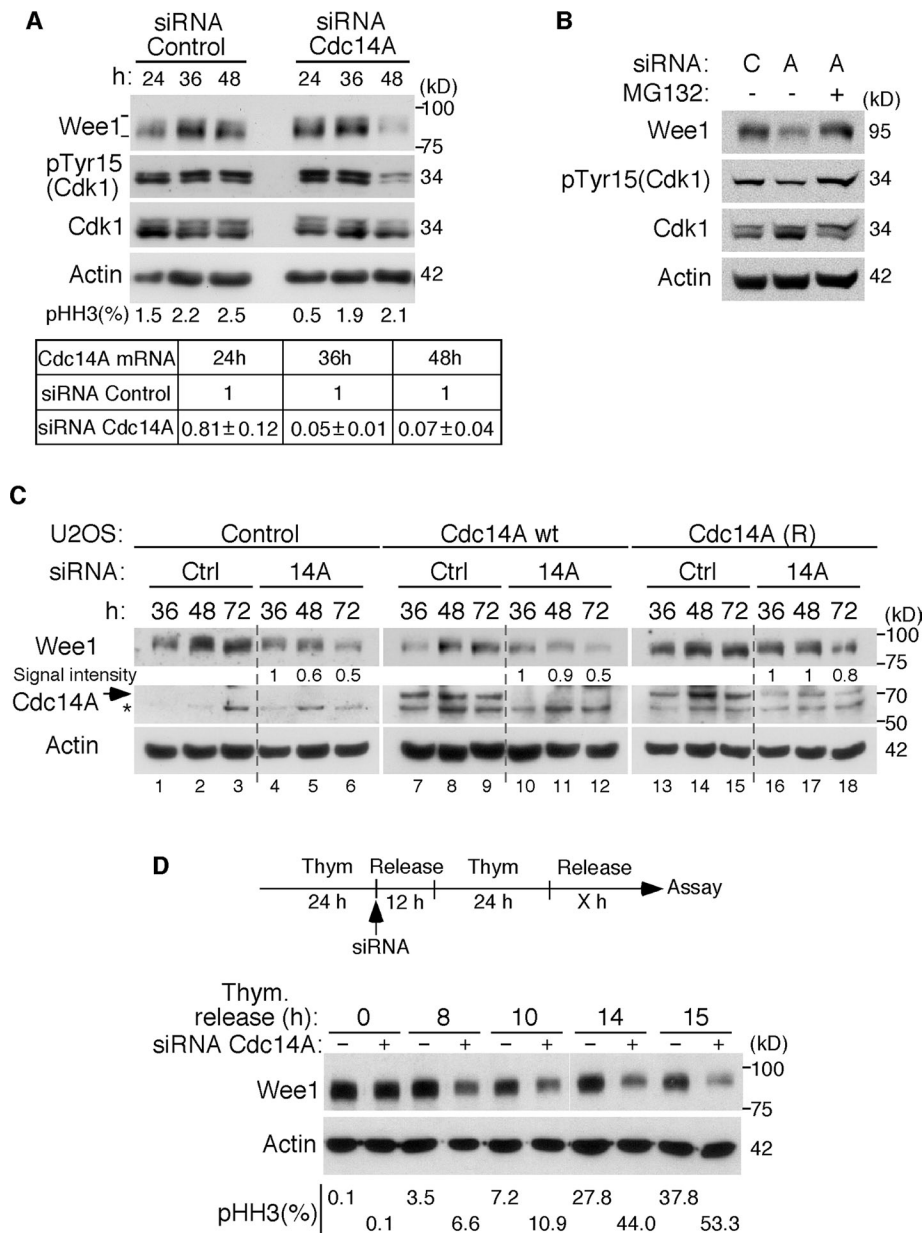


FIGURE 1: Depletion of Cdc14A causes a reduction of Wee1 protein levels. (A) Asynchronously growing U-2-OS cells were transfected with Cdc14A or control siRNAs and grown for 24, 36, or 48 h. Cellular extracts were obtained and analyzed by immunoblot against the indicated proteins. Cdc14A mRNA levels were analyzed at each time point using real-time PCR in triplicate measurements (\pm SD). The value given for Cdc14A mRNA in control cells was set as 1. The percentage of mitotic cells was measured by fluorescence-activated cell sorting analysis using anti-phospho-histone H3 antibody. (B) U-2-OS cells were treated with Cdc14A (A) or control (C) siRNAs for 48 h. Where indicated, MG132 (20 μ M) was added to the culture and maintained during the last 6 h. The levels of Wee1 protein were analyzed by immunoblot in the corresponding cell lysates. (C) U-2-OS cells infected with retroviruses expressing empty vector (control), Cdc14A wild type (wt), or siRNA-resistant Cdc14A (R) (a Cdc14A cDNA with four silent mutations in the sequence corresponding to siRNA sequence) were transfected with control or Cdc14A siRNAs. Cellular extracts were obtained at the indicated times and probed for Wee1 and Cdc14A. Relative Wee1 degradation was quantified by densitometry. Wee1 signal intensity was normalized to the loading control (actin) and expressed as the amount relative to the corresponding 36-h sample, which was set as 1. Note that the anti-Cdc14A antibody is able to recognize ectopically expressed Cdc14A but not the endogenous protein levels. (D) U-2-OS cells were synchronized in G1/S by double thymidine treatment and transfected with control or Cdc14A siRNAs after the first thymidine arrest. Cells were then released into fresh medium containing nocodazole to trap mitotic cells, and samples were taken at different time points as they progressed to mitosis for the immunoblotting and phospho-histone H3 positivity analyses. Asterisk, unspecific cross-reacting band. These blots are representative from at least three different experiments.

modification (Supplemental Figure S3B). Because the depletion of Cdc14B did not have any effect on Wee1 protein levels in normally cycling cells (Supplemental Figure S3C), we conclude that Cdc14A and Cdc14B phosphatases might regulate Wee1 in a different manner. Our work henceforth focuses on the role of the human Cdc14A isoform in Wee1 regulation.

Cdc14A interacts with and dephosphorylates Wee1

To check whether Wee1 kinase is a Cdc14A substrate, we first analyzed the molecular interactions between Cdc14A and Wee1 in the cell. Because the antibodies available do not detect endogenous Cdc14A, we used the Myc-Cdc14A fusion proteins expressed in HEK293T cells. As shown in Figure 3A, the overexpressed Myc-Cdc14A coimmunoprecipitated with the endogenous Wee1. No interaction was observed, however, between Wee1 and the dual Cdc25A phosphatase under the same overexpression conditions (Figure 3B), suggesting a specific interaction between Cdc14A and Wee1 proteins. Wee1 kinase contains 16 potential phosphorylation sites for CDKs, which, except for one of them (Ser-472), lie within the amino-terminal regulatory domain (Figure 3C). To test whether Cdc14A interacted with Wee1 through this domain, we coexpressed hemagglutinin (HA)-tagged, full-length Wee1, N-terminal (amino acids [aa] 1–257) or C-terminal (aa 258–646) halves of Wee1 and Myc-Cdc14A proteins in HEK293T cells. As shown in Figure 3, D and E, only the full-length or amino-terminal domain of Wee1 bound to Myc-Cdc14A, suggesting that the CDK-dependent phosphorylation state of Wee1 could mediate binding with the Cdc14A phosphatase.

Next, to see whether Wee1 was a substrate of Cdc14A phosphatase, we first performed *in vitro* phosphatase assays using Wee1 immunoprecipitates obtained from Cdc14A U-2-OS noninduced cells (control conditions) and recombinant GST-Cdc14A or GST-Cdc14A(PD) proteins purified from *Escherichia coli*. As shown in Figure 4A, incubation of Wee1 with wild-type Cdc14A, but not with the inactive Cdc14A(PD) form, resulted in some degree of Wee1 dephosphorylation, indicating that Cdc14A was able to dephosphorylate Wee1. As mentioned, Wee1 is phosphorylated by several kinases, among which mitotic Cdk1 is present. Because Cdc14A preferentially reverses CDK-dependent phosphorylations, we then tested whether Cdc14A was able to remove Cdk1-cyclin B1-dependent Wee1 phospho-residues. To prevent the autophosphorylation of Wee1, we generated a kinase-dead

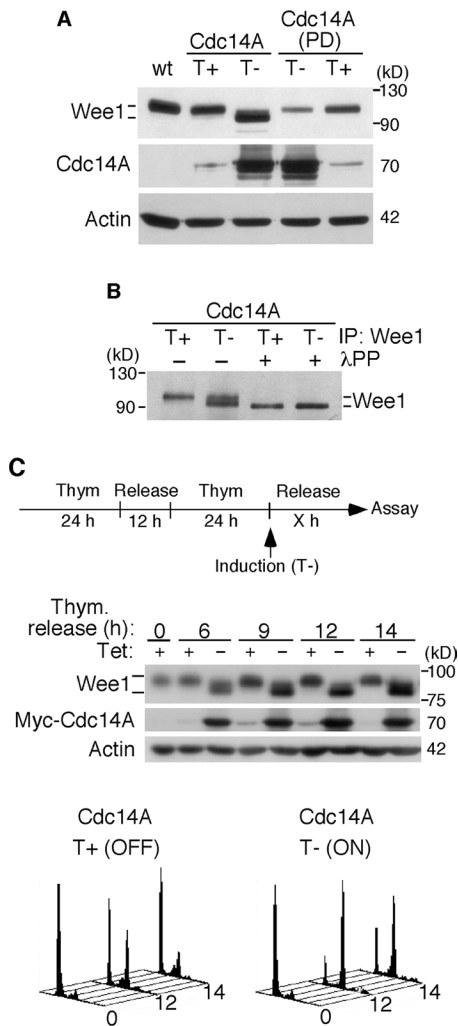


FIGURE 2: Wee1 is dephosphorylated in cells overexpressing Cdc14A. (A) U-2-OS cell lines conditionally expressing active Cdc14A or its catalytically inactive form, Cdc14A(PD), were left untreated (T+) or induced (T-) to express the transgenes by removal of tetracycline, and cell lysates were processed for immunoblotting with the indicated antibodies. (B) The U-2-OS Cdc14A cell line was left untreated or induced to express wild-type Cdc14A for 24 h, and cell extracts were obtained. Wee1 protein was then immunoprecipitated with anti-Wee1 antibodies and incubated with λ phosphatase (λ PP). The dephosphorylation of Wee1 was monitored by immunoblotting. (C) U-2-OS-Myc-Cdc14A cells, synchronized at the G1/S transition by double thymidine treatment, were released and induced to express the transgene (top) or kept noninduced (control conditions). Samples were taken for flow cytometry (bottom) and immunoblot analyses at the indicated times after release. The data shown are representative of three different experiments.

(KD) derivative by replacing lysine by arginine-328 of the kinase domain. In vitro autophosphorylation assays confirmed that the Wee1(KD) mutant was inactive (Figure 4B, lane 1). Recombinant glutathione *S*-transferase GST-Wee1(KD) was first phosphorylated by Cdk1-cyclin B1 complexes and then incubated with GST-Cdc14A or the inactive form GST-Cdc14A(PD). As shown in Figure 4B, Cdc14A was able to decrease the phosphorylation signal of Wee1. Finally, to further test the ability of Cdc14A to reverse CDK-mediated serine phosphorylations (Bremmer *et al.*, 2011), we immunoprecipitated protein extracts obtained from HEK293T cells coexpressing

HA-tagged Wee1 and Myc-tagged Cdc14A or Cdc14A(PD) with anti-HA and immunoblotted them with specific anti-phospho-Ser (CDK substrates) antibody. As shown in Figure 4C, the ectopic expression of Cdc14A efficiently reversed the Cdk-mediated serine phosphorylations of Wee1. Taken together, all these results suggest that Cdc14A interacts with and dephosphorylates Cdk-dependent phosphorylation sites of Wee1.

Cdc14A dephosphorylates Wee1 at Ser-123 and Ser-139 residues

To understand the mechanism by which Cdc14A regulates Wee1 turnover, we first investigated the phosphorylation sites reversed by Cdc14A phosphatase. It was shown that Cdk1 phosphorylation at Ser-123 is involved in Wee1 degradation at the G2/M transition (Watanabe *et al.*, 2004, 2005). In light of this, we postulated that this residue might be the ideal candidate as target for Cdc14A. Moreover, an as-yet-uncharacterized residue close to Ser-123 and conserved in mammals, Ser-139, also corresponds to the full canonical site for CDK phosphorylation, Ser/Thr-Pro-X-Arg/Lys. These observations prompted us to focus on these two residues as putative Cdc14A targets. In vitro phosphatase assays performed with the corresponding nonphosphorylatable mutant (double S123/139A, 2A mutant) afforded the first evidence concerning the possibility that these two residues might be Cdc14A dephosphorylation sites. Thus Cdc14A removed some Cdk1 phosphorylation in the wild-type amino-terminal domain of Wee1 (Figure 5A, lane 2). However, when both Ser-123 and Ser-139 were modified (2A), although Wee1 was still phosphorylated by Cdk1, treatment with active Cdc14A did not decrease the phosphorylation signal to any significant extent (Figure 5A, lane 5), indicating that Cdc14A dephosphorylates Wee1 at Ser-123 and Ser-139 residues. These data suggested that phosphorylation of Ser-139 could also be involved in the control of Wee1 turnover and that Cdc14A could regulate Wee1 through these two residues.

To confirm in vivo phosphorylation of Wee1 at Ser-139, we generated an affinity-purified phosphospecific antibody directed against sequences surrounding Wee1-phosphorylated Ser-139 (pSer-139-Wee1). To facilitate the immunoprecipitation of Wee1, we used HEK293T cells expressing HA-tagged Wee1. Wee1 was immunoprecipitated from these cells and subjected to immunoanalysis with pSer-139-Wee1 antibody. As shown in Figure 5B, HA-tagged Wee1 immunoprecipitated from enriched mitotic HEK293T cells was phosphorylated at Ser-139 and dephosphorylated by active Cdc14A. Moreover, Cdc14A also dephosphorylated pSer-123-Wee1 in vitro, as detected by commercially available antibodies (Figure 5C). Then, to confirm in vivo Cdc14A dephosphorylation of Wee1, we examined whether depletion of Cdc14A would cause hyperphosphorylation of Wee1 at Ser-123 and Ser-139. Because hyperphosphorylation of Wee1 drives it to its degradation, making technically difficult the detection of these phosphoserines before degradation, we tested phosphorylation of Wee1 in U-2-OS cells depleted for Cdc14A and treated with the proteasome inhibitor MG132. As shown in Figure 5D, Wee1 kinase from cells treated with Cdc14A siRNAs and MG132 had increased levels of both Ser-123 and Ser-139 phosphorylation as compared with control cells.

Wee1 Ser-139 is a newly identified Cdk phosphoresidue with a role in the regulation of its turnover

The phosphorylation of Wee1 at Ser-139 was also checked by studying how the change of this residue to the nonphosphorylatable amino acid alanine (S139A mutant) affected the total Wee1 phosphorylation state in the cell. In parallel, we also tested Wee1

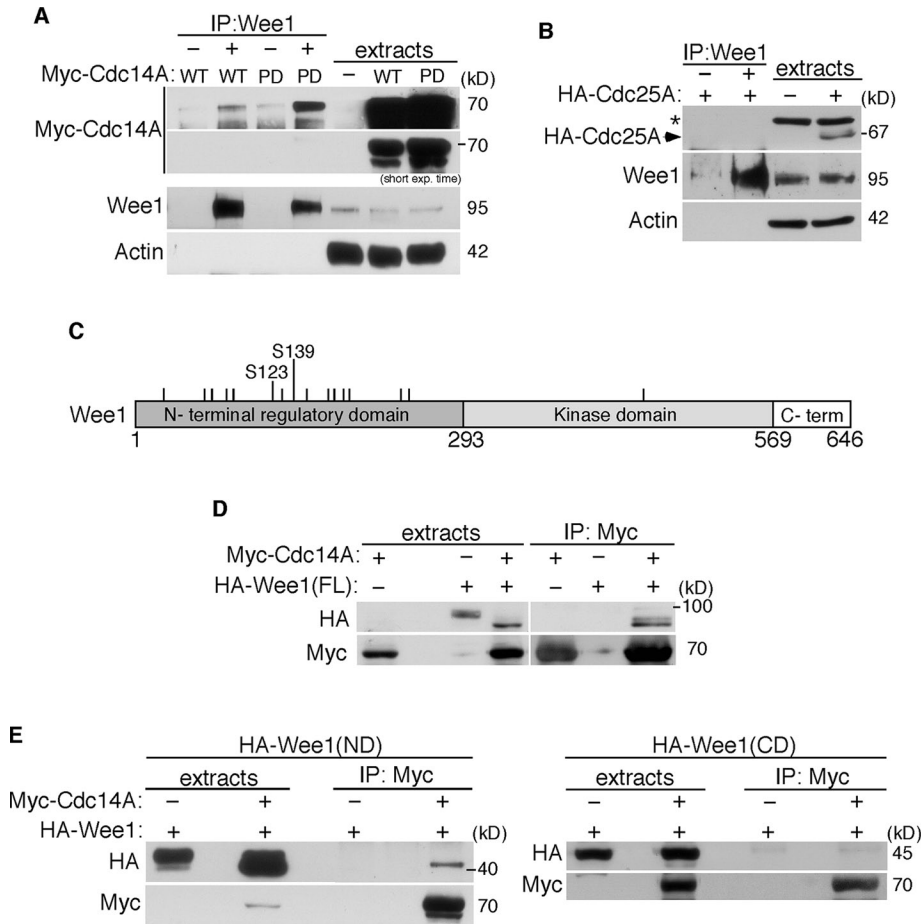


FIGURE 3: Wee1 interacts with Cdc14A through its amino regulatory region. (A, B) HEK293T cells were transfected with Myc-Cdc14A, Myc-Cdc14A(PD), or HA-Cdc25A. After 24 h of transfection, endogenous Wee1 was immunoprecipitated with anti-Wee1 antibody and analyzed by immunoblotting to detect the presence of tagged Cdc14A (A) or Cdc25A (B), respectively, and Wee1. Cellular extracts were also probed for the indicated antigens. Asterisk, unspecific cross-reacting band. (C) Distribution of CDK phosphorylation consensus sites (bars) on Wee1. Ser-123 and -139 correspond to the full consensus sequence Ser/Thr-Pro-X-Arg/Lys, where X represents any amino acid. (D) HEK293T cells were cotransfected with Myc-Cdc14A and full-length (FL) HA-Wee1. After 40 h of transfection, cellular extracts were obtained, and the presence of Cdc14A and Wee1 was analyzed by immunoblotting in anti-Myc-Cdc14A immunoprecipitates. (E) HEK293T cells were cotransfected with Myc-Cdc14A and HA-Wee1 N-terminal (ND; aa 1–257) or C-terminal (CD; aa 258–646) domains of Wee1. After 40 h of transfection, cellular extracts were immunoprecipitated with anti-Myc antibodies and analyzed by immunoblotting to detect the presence of the two proteins. The data shown are representative of at least two independent experiments.

phosphorylation when preventing phosphorylation of the already characterized Ser-123 residue (S123A mutant). We engineered U-2-OS cells that stably expressed retrovirally transduced, HA-tagged Wee1 wild type or the different alanine mutants at a moderate level. As shown in Figure 6A, both the S123A and S139A mutants already displayed a faster electrophoretic mobility shift than wild-type Wee1 during interphase. Moreover, we observed that the S139A mutant failed to undergo mitotic hyperphosphorylation to an even greater extent than the S123A mutant (Figure 6A). Accordingly, when the two residues were mutated, the gel mobility of Wee1 was even faster (Figure 6A). These results show that the phosphorylation of Ser-139 has a clear effect on the total Wee1 phosphorylation state, indicating that Ser-139 is phosphorylated *in vivo*. Moreover, and as expected, the treatment with the

specific CDK inhibitor purvalanol abolished this phosphorylation, indicating that Ser-139 is a CDK phosphorylation site (Figure 6B). We next analyzed the phosphorylation of Ser-139 at different phases during the cell cycle. Cells were synchronized at mitosis, G1, or G1/S phases and processed for the immunoprecipitation of HA-Wee1 and the detection of Ser-139 phosphorylation. We found that although some level of Ser-139 phosphorylation was already detected at G1/S, it was higher in mitosis (Figure 6C). As expected, at the G1 phase, when Wee1 was still low in abundance and appeared hypophosphorylated, no phosphorylation of Ser-139 was detected (Figure 6C). These results indicate that Wee1 is phosphorylated on Ser-139 as of early S phase, probably mediated by Cdk2, and that Cdk1 might be responsible for this modification at the G2/M transition.

To understand the biological significance of Ser-139 phosphorylation, we first tested whether the change of Ser-139 to the non-phosphorylatable residue alanine affected the function of Wee1. To achieve this, we assayed its effect on Cdk1 Tyr15 phosphorylation in transfected cells. As shown in Supplemental Figure S4, wild-type Wee1 increased Cdk1 Tyr15 phosphorylation as compared with empty vector or the kinase-dead Wee1 form. Moreover, the S139A mutant was as potent as wild-type Wee1, and the mutants S123A and 2A also showed similar kinase activities. Although we cannot exclude that the endogenous Wee1 protein cooperates with the ectopically expressed Wee1 versions, these results suggest that S139A does not affect the overall structure or function of Wee1 and that phosphorylation of this residue does not regulate Wee1 kinase activity.

Because human Wee1 is negatively regulated at the G2/M transition by phosphorylation-dependent degradation (Watanabe *et al.*, 2004, 2005), we analyzed the possible involvement of Ser-139 in Wee1 stability. First, we checked the turnover of Ser-139 Wee1 mutants in parallel with wild-type and S123A versions, the latter as an already described stabilizing mutation (Watanabe *et al.*, 2005), by using the inhibitor of protein synthesis cycloheximide. As shown in Figure 7A, both the S123A and S139A mutants were more stable than wild-type Wee1. Moreover, the turnover of 2A mutant was significantly slower than that of wild type, although this double mutation did not fully block Wee1 degradation. Furthermore, the change of Ser-139 to Asp (S139D), an amino acid that mimics constitutive phosphorylation, resulted in a more labile protein as compared with wild-type Wee1 (Figure 7A). These data suggest that the phosphorylation of Ser-139 is required for proper Wee1 turnover and that additional phosphorylation sites (other than Ser-123 and Ser-139) are involved.

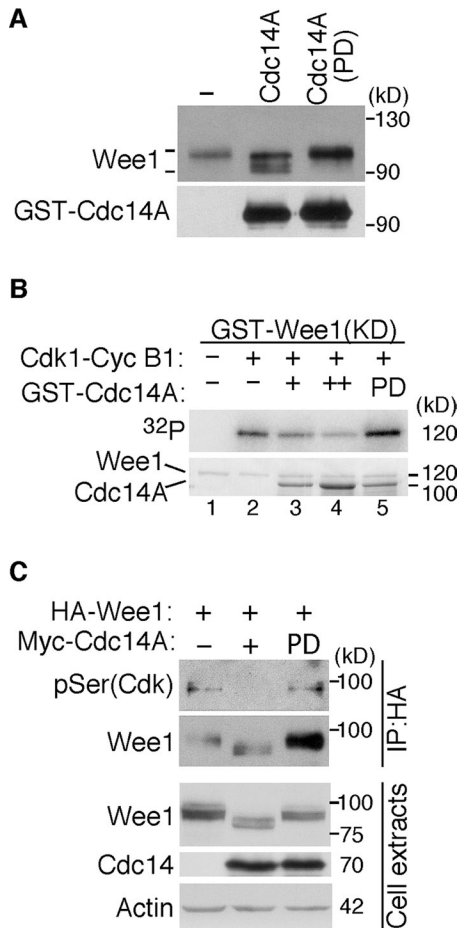


FIGURE 4: Cdc14A dephosphorylates Wee1. (A) Wee1 protein was obtained by immunoprecipitation with anti-Wee1 antibodies from the noninduced U-2-OS-Myc-Cdc14A cellular extracts (500 μ g) and incubated with 100 ng of GST-Cdc14A or its inactive form, GST-Cdc14A(PD). Dephosphorylation of Wee1, detected by its different SDS-PAGE gel mobility, and the presence of the indicated Cdc14A forms detected by immunoblotting. (B) GST-Wee1(KD), GST-Cdc14A, and GST-Cdc14A(PD) fusion proteins were expressed and purified from *E. coli*. Inactive Wee1 kinase was first incubated with recombinant Cdk1-cyclin B1 in the presence of [γ - 32 P]ATP. Then it was washed extensively and treated with active or inactive GST-Cdc14A phosphatases. Reactions were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Coomassie staining (bottom) and autoradiography (top). (C) HEK293T cells were cotransfected with HA-tagged Wee1 and Myc-tagged Cdc14A or Myc-tagged Cdc14A(PD). After 40 h, protein extracts were obtained, and Wee1 was immunoprecipitated with anti-HA antibodies and subjected to immunoblotting with phosphoserine (Cdk substrates) and anti-total Wee1 antibodies. Cell lysates were also analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. The data shown are representative of three different experiments.

Cdc14A regulates Wee1 stability through dephosphorylation on Ser-123 and Ser-139

To finally corroborate that the mechanism by which Cdc14A regulates Wee1 stability was indeed the dephosphorylation of Ser-123 and Ser-139 residues, we tested the effect of Cdc14A deficiency in cells expressing the Wee1 2A mutant, whose turnover cannot be regulated by these two residues. U-2-OS cells stably expressing retrovirally transduced, HA-tagged Wee1 wild-type or 2A mutant at a moderate level were transfected with control or Cdc14A siRNAs and

analyzed by immunoblot at 48 and 72 h posttransfection. As observed in Figure 7B, the levels of the Wee1 2A mutant were not significantly reduced after treatment with Cdc14A siRNAs. Taken together, these data suggest that Cdc14A phosphatase regulates Wee1 stability through Ser-123 and Ser-139 dephosphorylation.

Because it was shown that at the G2/M transition Wee1 degradation is mediated by Cdk1-primed Plk1 phosphorylation (Watanabe *et al.*, 2005), we then investigated whether the phosphorylation of Ser-139 might be involved in the Wee1-Plk1 interaction. As expected, Plk1 was efficiently coimmunoprecipitated with wild-type Wee1 (Figure 7C). However, this molecular interaction was strongly reduced with both S123A (as already reported by Watanabe *et al.*, 2004) and S139A mutants and was not detected with the 2A mutant (Figure 7C). These results suggested that both Ser-123 and Ser-139 residues must be phosphorylated to allow efficient interaction between Wee1 and Plk1 kinases.

DISCUSSION

In vertebrate cells, a role for Cdc14 phosphatases in the control of Cdk1 activity has been reported. This function is carried out, at least in part, through the regulation of Cdc25 phosphatase activity (Krasinska *et al.*, 2007; Vázquez-Novelle *et al.*, 2010; Sacristán *et al.*, 2011; Tumurbaatar *et al.*, 2011). The activation of Cdk1-cyclin B1 complexes is controlled by the opposing activities of Wee1/Myt1 kinases and Cdc25 phosphatases, which regulate the Cdk1 Thr-14 and Tyr-15 phosphorylation state. When active, these kinases and phosphatases are in turn inhibited or positively regulated, respectively, by direct Cdk1 phosphorylation, thereby further amplifying Cdk1 activation. Human Cdc14A interferes with the positive Cdc25-mediated feedback loop that controls the activation of Cdk1-cyclin B1 to promote entry into mitosis (Vázquez-Novelle *et al.*, 2010).

In mammalian cells, the phosphorylation of Wee1 by Cdk1 promotes its degradation at the G2/M transition (Watanabe *et al.*, 2004). By using siRNA-mediated treatment, here we show that Cdc14A plays a role in the regulation of Wee1 protein levels. Cdc14A-depleted cells displayed reduced levels of Wee1 when growing asynchronously and also when the cells were synchronized at late G2 phase. The decrease in the level of Wee1 protein was a result not of altering Wee1 transcription, but instead of stabilizing the protein. We also observed that the ectopic expression of Cdc14A during G2 resulted in the accumulation of dephosphorylated Wee1. These results suggest that Cdc14A modulates entry into mitosis by counteracting phosphorylation-dependent Wee1 degradation.

The Cdk-dependent phosphorylation of Wee1 at Ser-123 allows binding with β -TrCP E3 ubiquitin ligase (Watanabe *et al.*, 2004, 2005). Moreover, phospho-Ser-123 promotes additional Wee1 phosphorylation at Ser-121 and Ser-53 by CK2 and Plk1 kinases, respectively, which creates another β -TrCP binding site responsible for the ubiquitination and proteasome-mediated degradation of Wee1 at the G2/M transition (Watanabe *et al.*, 2004, 2005). We show here that Cdc14A dephosphorylates Wee1 at Ser-123, suggesting that Cdc14A deficiency may enhance phosphorylation-dependent Wee1 degradation. We further show that the instability of Wee1 in Cdc14A-depleted cells also reflects an additional site-specific dephosphorylation, at Ser-139, which fulfills the strict requirement for a CDK consensus site (Nigg, 1995). The phosphorylation of Wee1 at Ser-139 was already detectable at the G1/S transition and was higher in mitosis, when Cdk1-cyclin B1 complexes become active. Our results clearly suggest that Cdc14A regulates Wee1 stability through the dephosphorylation of both the Ser-123 and Ser-139 residues.

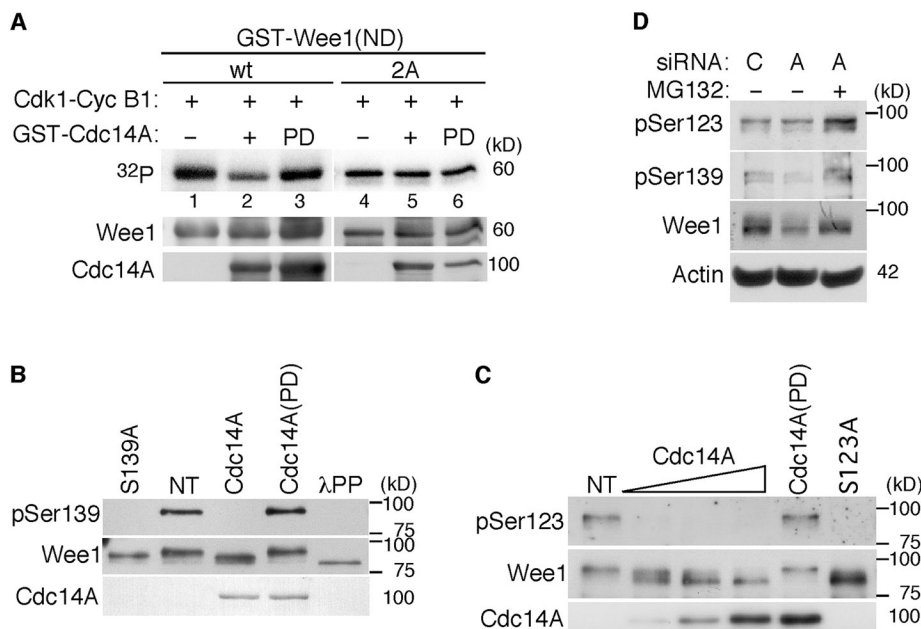


FIGURE 5: Cdc14A dephosphorylates Wee1 at Ser-123 and Ser-139. (A) The Ser-123 and Ser-139 residues were mutated to the nonphosphorylatable Ala by site-directed mutagenesis (2A mutant) in the recombinant GST–N-terminal domain of Wee1 (GST–Wee1(ND)). Wild-type and Wee1 2A mutant were expressed and purified from *E. coli*. GST–Wee1 fusion proteins were first phosphorylated with Cdk1–cyclin B1 complexes in the presence of [γ - 32 P]ATP and then incubated with GST–Cdc14A phosphatase or its inactive form, GST–Cdc14A(PD). Proteins were resolved by SDS–PAGE gels, and phosphorylation was detected by autoradiography. The same membrane was then reprobed with anti–Wee1 and anti–Cdc14A antibodies to check the amount of Wee1 and Cdc14A proteins loaded. (B, C) HEK293T cells were transfected with HA-tagged Wee1, and after 12 h of transfection, cells were treated with nocodazole (12 h) to accumulate cells in mitosis. Cell lysates were prepared, and Wee1 was immunoprecipitated with anti–HA antibodies and treated with active Cdc14A, the inactive phosphatase form Cdc14A(PD), or λ PP, where indicated. Reactions were resolved by SDS–PAGE gels, and phosphorylation at Ser-123 or Ser-139 was analyzed with anti–pSer-123(Wee1) or anti–pSer-139(Wee1) antibodies, respectively. The amount of total Wee1 was analyzed on the same filter by sequentially immunoprobining with anti–Wee1 antibodies. Immunoblotting with anti–Wee1 antibody also demonstrated a shift in mobility after treatment with active Cdc14A or λ PP. The presence of Cdc14A was determined with anti–Cdc14A antibodies. Two mutants of Wee1 in which the Ser-123 or -139 was changed to alanine, S123A and S139A, respectively, were immunoprecipitated, as indicated for wild-type HA–Wee1 protein, and used as anti–pSer-123 or anti–pSer-139 Wee1 negative controls. NT, nontreated immunoprecipitates. (D) U-2-OS cells were treated with Cdc14A (A) or control (C) siRNAs for 48 h. Where indicated, MG132 (20 μ M) was added to the culture and maintained during the last 6 h. Cellular extracts were prepared and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. The data shown are representative of at least three independent experiments.

The newly identified Cdk-mediated Wee1 phosphorylation site, Ser-139, appears to be involved in its degradation at entry into mitosis. Thus mutation of this residue to alanine confers marked stability to the protein, and the protein turnover of the corresponding mutant mimicking a constitutive phosphorylation is slightly accelerated when compared with the wild-type protein. Moreover, although the single mutation of the previously characterized Ser-123 interferes with the interaction of Wee1 with Plk1 kinase (Watanabe *et al.*, 2005, and the present work), this interaction was also altered in a S139A mutant, with the concomitant mutation of Ser-123 and Ser-139 completely disrupting the Wee1–Plk1 interaction. This key observation suggests that Cdk1–cyclin B1 might phosphorylate these two nearby residues to prime Plk1 phosphorylation and the consequent protein degradation and that the lack of modification in any of them reduces binding efficiency with Plk1 kinase. The Ser-139 is not, however, within a known consensus motif for a Plk1-docking

site. It could be that phosphorylation of those two proximal residues (Ser-123, Ser-139) favors a particular protein conformation, which, in turn, facilitates pSer-123-mediated Plk1 interaction and the consequent recognition by the ubiquitin ligase SCF (Skp1/cullin/F-box)- β -TrCP. As mentioned, although the phosphorylation of Ser-139 was higher in mitosis, it was also observed during S and G2 phases. Thus Cdk2 might also be the kinase responsible for this phosphorylation, which together with phosphorylation of Ser-123 (Watanabe *et al.*, 2005) may contribute to the basal rate of Wee1 turnover during interphase.

We also show that the double 2A Wee1 mutant, although more stable than wild-type Wee1, is still degraded in mitosis, suggesting that additional mechanisms are involved in the regulation of human Wee1 stability at the G2/M transition. Different regions of Wee1, among which the activation domain is included, are also involved in the control of its degradation (Owens *et al.*, 2010). Moreover, the phosphorylation of Ser-472, a potential CDK site in this domain, also seems to affect the rate of Wee1 turnover (Owens *et al.*, 2010). Taken together, these data indicate that Wee1 degradation is mediated by a precise and complex pattern of phosphorylations in which different kinases are involved. The Wee1 hyperphosphorylated state is reached at the onset of mitosis, making the protein labile at this point of the cell cycle. In addition, it was suggested that a hypophosphorylated form of Wee1 could also render the protein more unstable (Watanabe *et al.*, 1995). Wee1 kinase is also regulated by changes in its subcellular localization in human cells. Thus the phosphorylation of Wee1 at Ser642 by Akt accelerates the cytoplasmic localization of Wee1 at the G2/M transition (Katayama *et al.*, 2005). The nuclear export of Wee1 is also mediated by Cdk2–cyclin A phosphorylation at Thr-239 (Li *et al.*, 2010). The Wee1

nuclear export does not seem to be essential, however, for entry into mitosis (Li *et al.*, 2010). Moreover, it is possible that different posttranslational modifications, other than reversible phosphorylation events, also regulate Wee1 stability in human cells.

Our results suggest that human Cdc14A constitutes a key element in the complex network for Wee1 regulation at the entry into mitosis. By promoting Wee1 stability, Cdc14A participates in maintaining the interphase state when cells are not ready for nuclear division (see model in Figure 8). Thus siRNA-mediated down-regulation of Cdc14A accelerates entry into mitosis (Vázquez-Novelle *et al.*, 2010). However, this phenotype has not been observed in Cdc14-knockout cell lines, which do not show any obvious defect in cell cycle progression (Mocciaro *et al.*, 2010). Among previously discussed possibilities trying to explain discrepancies between knockout and siRNA depletion data (Mocciaro and Schiebel, 2010), we favor the idea that the permanent lack of Cdc14A could be

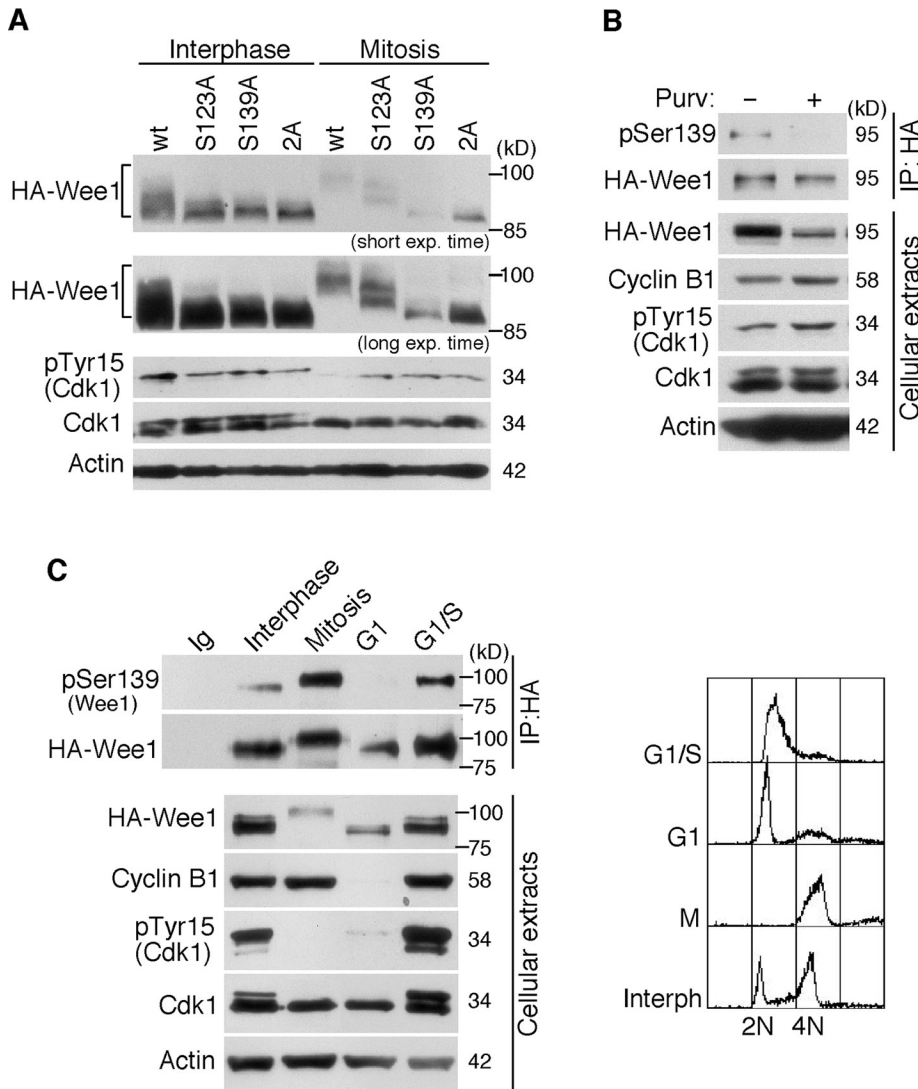


FIGURE 6: Human Wee1 is phosphorylated by Cdk1–cyclin B1 at Ser-139. (A) U-2-OS cells stably expressing retrovirally transduced, HA-tagged Wee1 wild type (wt) or the different phosphorylation Wee1 mutants at a moderate level were treated with nocodazole for 12 h to obtain mitotic cells. Rounded mitotic cells were collected, and the cells that remained attached were also harvested and considered as interphase cells. Cellular extracts were obtained and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. (B) HEK293T cells transiently expressing HA-tagged Wee1 were treated with the vehicle dimethyl sulfoxide or the CDK inhibitor purvalanol A for 6 h. Wee1 was immunoprecipitated with anti-HA antibody and analyzed with both specific p-Ser-139(Wee1) and anti-Wee1 antibodies. Cell lysates were also analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. (C) U-2-OS cells stably expressing retrovirally transduced, HA-tagged Wee1 were synchronized at the indicated phases of the cell cycle. Cells were arrested in mitosis by nocodazole treatment (12 h). Mitotic cells were collected (mitosis) or released from the arrest and harvested after 4 h of growth (G1). Cells that remained attached to the plates after nocodazole treatment were harvested and considered as interphase cells. For G1/S-synchronized cells, the cultures were subjected to a double thymidine treatment. Synchronization was checked by fluorescence-activated cell sorting (right) and immunoblot analyses. HA-Wee1 was immunoprecipitated with anti-HA antibodies and subjected to immunoblot with anti-pSer-139(Wee1) and anti-Wee1 antibodies. These results are representative of three independent experiments.

compensated in the long term by other phosphatases in knockout cells. This is based on the fact that knockout cell lines are generated by selection. However, the nature of siRNA-mediated protein depletion likely avoids compensation because of the short window of time for compensatory phosphatases to act, thus revealing some phenotypes undetectable in knockout cell lines.

et al., 2009; Wicky *et al.*, 2011). Therefore Wee1 could be regulated by different phosphatases, as it is targeted by different kinases responsible for its inhibitory hyperphosphorylation state in mitosis. An attractive hypothesis is that these phosphatases could act on different or the same Wee1 phosphoresidues to integrate diverse signaling inputs; they could act at different subcellular locations or under

Wee1 is predominantly nuclear, but it has also been found to associate with centrosomes. Cdc14A localizes to centrosomes during interphase, and it spreads throughout the cell during mitosis (Kaiser *et al.*, 2002; Mailand *et al.*, 2002). Thus Cdc14A-mediated Wee1 regulation could take place at the centrosomes during interphase. Alternatively, Cdc14A could act when released from the centrosome at the onset of mitosis. Cdc14B is able to dephosphorylate Wee1; however, in clear contrast with the observed function for Cdc14A, Wee1 protein levels remain unaffected in asynchronous Cdc14B-depleted cells. Given that Cdc14B is maintained in the nucleolus during G2, one possibility is that regulation of Wee1 is specific for the centrosomal Cdc14A isoform and that it is at the centrosome where Cdc14A regulates the Wee1 kinase in a normal cell cycle. It has been shown that after G2 DNA damage, no change in subcellular localization is observed for Cdc14A; however, Cdc14B isoform moves from the nucleolus to the nucleoplasm (Bassermann *et al.*, 2008). In fission yeast, replication stress also induces changes in the subcellular localization of Flp1/Cdc14 from the nucleolus to the nucleus (Díaz-Cuervo and Bueno, 2008). These findings support the possibility that Cdc14B isoform could be involved in the regulation of Wee1 upon genotoxic stress. This hypothesis deserves further investigation.

The regulation of Wee1 has been addressed in numerous studies, from which it has become evident that multiple phosphorylation events, carried out by different kinases, play an important role. Our results indicate that Wee1 is a substrate of Cdc14 phosphatases in human cells and that by reversing specific Cdk1 phosphorylation, the Cdc14A isoform induces Wee1 stability, which in turn directly inhibits Cdk1 activity. Given that Cdc14A also acts on Cdc25 phosphatases (Krasinska *et al.*, 2007; Vázquez-Novelle *et al.*, 2010), taken together, our data suggest that Cdc14A modulates Cdk1 activity by directly controlling the two major CDK regulators, Wee1 and Cdc25, responsible for the negative and positive feedback loops, respectively, established with Cdk1. It also has been suggested that PP2A phosphatase regulates Cdc25 and Wee1 phosphorylation, thus controlling Cdk1 activity during interphase (Mochida

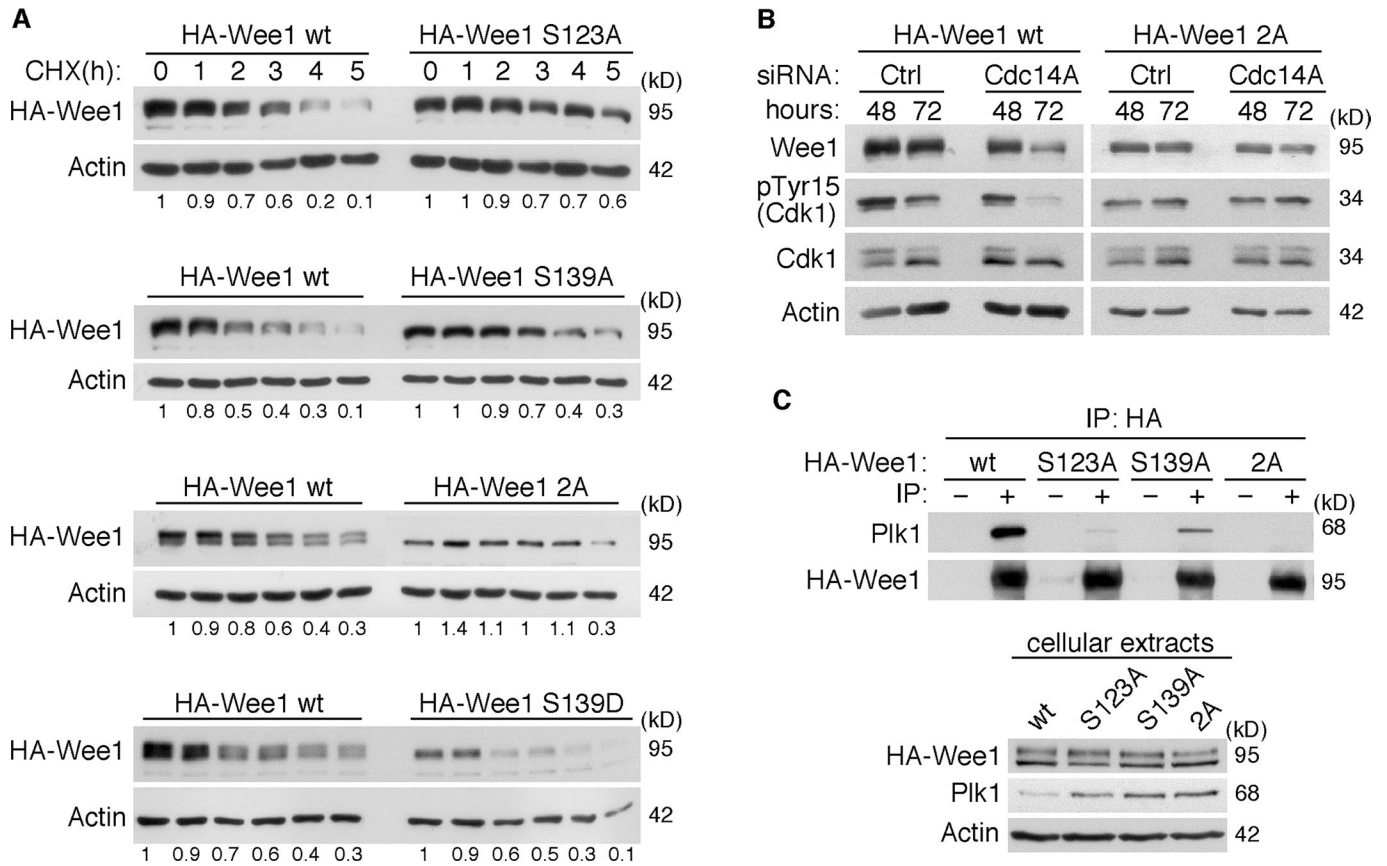


FIGURE 7: (A) Phosphorylation of Wee1 at Ser-139 is required for normal Wee1 turnover. HEK293T cells were transfected with HA-tagged, wild-type Wee1 (wt) or the different HA-tagged Wee1 mutants (S123A, S139A, S139D, and S123/139A or 2A). At 24 h posttransfection, cells were treated with cycloheximide to inhibit protein synthesis and then harvested at the indicated time points to check HA-Wee1 protein levels by immunoblotting. HA-Wee1 bands were quantified and normalized with respect to actin. HA-Wee1 protein levels from 0 h were considered as 1. The data are representative of three independent experiments. (B) Cdc14A dephosphorylates Wee1 at Ser-123 and Ser-139 to regulate Wee1 stability. U-2-OS cells stably expressing retrovirally transduced, HA-tagged Wee1 wt or the double 2A mutant were treated with control or Cdc14A siRNAs for 48 or 72 h. Cellular extracts were obtained and analyzed by immunoblotting against the indicated proteins. These blots are representative of three independent experiments. (C) Recombinant HA-Wee1 proteins (wt, S123A, S139A, or 2A mutants) were expressed in HEK293T cells, immunoprecipitated with anti-HA antibodies, and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. This experiment was performed twice.

different cellular conditions. All of these regulatory steps would finally contribute to refine the control of entry into mitosis.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture, synchronization, and drug treatments

Derivatives of the U-2-OS cell line conditionally expressing Cdc14A alleles were from the laboratory of J. Lukas (Mailand *et al.*, 2002). Cells were maintained and induced to express the transgenes as described previously (Vázquez-Novelle *et al.*, 2010). HCT116-Cdc14B^{flox/flox} cells were from P. Jallepalli (Berdougo *et al.*, 2008). U-2-OS and HEK293T cells were cultured in DMEM supplemented with 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin G, 0.1 mg/ml streptomycin, and 10% fetal bovine serum at 37°C/5% CO₂ and used for infection and transient transfection experiments, respectively. HEK293T cells were transfected with the calcium phosphate/HEBS (HEPES-buffered saline solution) method. U-2-OS cells were synchronized in G1/S phase by double thymidine treatment. Briefly, thymidine, 2.5 mM, was added for 24 h, followed by a release period of 12 h and a second treatment with thymidine for a further 24 h. Then the cells were released to fresh culture medium after extensive washing

with phosphate-buffered saline (PBS). Where indicated, nocodazole (50 ng/ml) was added to avoid exit from mitosis. Mitotic cells were obtained by shaking off the rounded cells after 12 h of treatment with nocodazole (50 ng/ml). The proteasome inhibitor MG132 (20 μM; Calbiochem, La Jolla, CA) was added to the culture medium for 6 h. For estimation of the protein half-life, the cultures were treated with cycloheximide (25 μg/ml) for the indicated times.

Plasmids, mutagenesis, and virus production

Human Wee1 cDNA was cloned into the pCEFL-HA mammalian expression vector using *Bam*HI and *Eco*RI restriction enzyme sites. Two truncated constructions corresponding to the amino domain (aa 1–257) and carboxyl domain (aa 258–646) were generated by PCR using the primers 5′-CGCGGATCCATGAGCTTCCTGAGCCGACAG-3′, 5′-CCGGAATTCTCAGTATATAGTAAGGCTG-3′, 5′-CCGGAATTCGGATCCTATTGGAATGATTCCTGTGGTG-3′, and 5′-CCGGAATTCTCACGTTCTCTTTCTACGACGACAC-3′. Kinase-dead (K328R), Ser-123A, Ser-139A, or Ser-123/139A (2A) mutants were generated using site-directed mutagenesis. For bacterial expression in *E. coli* and the subsequent purification of recombinant

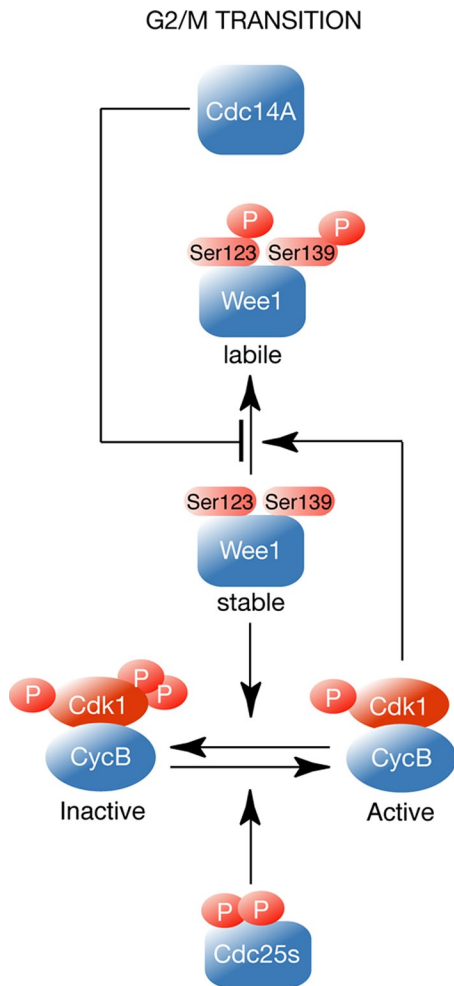


FIGURE 8: Model of Cdc14A function in the regulation of human Wee1. At the G2/M transition Cdc14A reverses Cdk1-mediated Wee1 phosphorylation at serines 123 and 139 to control Wee1 degradation.

GST proteins, wild-type and mutant Wee1 constructs were subcloned into a pGEX-4T-GST vector. GST-Cdc14A or GST-Cdc14A(PD) was cloned into pGEX-KG-GST. For viral infection, wild-type and mutant Wee1 cDNAs were subcloned into pBabe-puro retroviral expression vector. Retroviruses were produced in HEK293T cells and used to infect U-2-OS cells. Infected cells were selected by adding puromycin (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to the culture medium. pBabe-puro-EGFP plasmid was used to control infection efficiency.

Flow cytometry

For cell cycle analysis, cells were fixed in ice-cold 70% ethanol and stained with PBS containing 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ propidium iodide and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNaseA for 1 h at 37°C. For phospho-histone H3 positivity, cells were harvested and fixed in ice-cold 70% ethanol. Cells were washed with PBS-0.15% Triton X-100 and subsequently stained with anti-phospho-histone H3 and fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-rabbit antibodies. Then they were incubated with 8 mg/ml propidium iodide and 20 mg/ml RNase A solution for 1 h at 37°C. Stained cells were analyzed using a FACSCalibur device (BD Biosciences, San Diego, CA).

RNA interference

Cdc14A siRNA (5'-GGGACAUUGAUAGCCUGUUAUGUAA-3') and its corresponding siRNA control (low GC) were from Invitrogen

(Carlsbad, CA). The final concentration of the corresponding siRNA duplex in the culture medium was 60–100 nM. Transfection of U-2-OS cells was performed using Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Four extra silent mutations were introduced into Cdc14A cDNA in the area corresponding to siRNA duplex by PCR mutagenesis. The PCR oligos used are 5'-AGAACAGGGACCCTGATCGCCTGCTATGTAATG-3' and 5'-CATTACATAGCAGGCGATCAGGGTCCCTGTTCT-3'. The resulting Cdc14A mutant (Cdc14A [R]) was subcloned into pBabe-puro retroviral expression vector. Retrovirus were produced in HEK293T cells and used to infect U-2-OS cells. After 24 h of infection cells were grown in medium containing 0.5 mg/ml of puromycin for 72 h and then transfected with the corresponding siRNAs.

mRNA analyses

RNA was extracted from U-2-OS cells using the RNeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was performed from 1 μg of RNA using SuperScript First-Strand Kit (Invitrogen). Cdc14A primers were 5'-GTTCTGAACATCTGTGA-3' and 5'-GCATGTGTAACCTGTAG-3'. The 18S rRNA primers, used as internal control, were 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3' and 5'-CTTTCGCTCTGGTCCGTCTT-3'. Quantitative PCR analysis was performed according to standard procedures using the iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA).

Immunochemical techniques

For Western blotting, cells were harvested and lysed in buffer containing 0.5% NP40, 20 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT), 10 mM β -glycerophosphate, 5 mM NaF, and 1 mM Na_3VO_4 and supplemented with complete protease inhibitor mixture (Roche, Indianapolis, IN). The primary antibodies used in this study were Myc tag (9E10; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), HA tag (12CA5; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), Wee1 (sc-9037; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), phospho-Wee1-Ser-123 (PAB0632; Abnova, Taipei City, Taiwan), Cdk1 (sc-54; Santa Cruz Biotechnology), phospho-Tyr-15-Cdk1 (9111; Cell Signaling, Beverly, MA), β -actin (AC-15; Sigma-Aldrich), phospho-(Ser) CDKs (2324; Cell Signaling), Cdc14A (DCS-291; NeoMarkers, Fremont, CA), cyclin B1 (sc-752; Santa Cruz Biotechnology), Plk1 (33-1700; Zymed, San Francisco, CA), phospho-histone-H3(S10) (06-570; Millipore, Billerica, MA), and Nek9 (kindly provided by J. Roig, Institute for Research in Biomedicine, Barcelona, Spain). Rabbit polyclonal antibody specific for Wee1 phosphorylated at Ser-139 was raised against the Wee1 LGSSFS(p)PVRCG synthetic phosphopeptide. Serum from immunized rabbit was affinity purified on a specific phosphorylated peptide column. For the immunoprecipitation studies, cell lysates (0.5–1 mg of protein) were incubated with the corresponding antibodies (2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ extract) and protein G Dynabeads (Invitrogen) for 3 h at 4°C. Immunoprecipitates were collected by centrifugation, washed five times with lysis buffer, and subjected to SDS-PAGE electrophoresis and immunoblot analysis.

Kinase and phosphatase assays

Recombinant GST-Wee1(KD) was phosphorylated by Cdk1-cyclin B1 (New England BioLabs, Ipswich, MA) in the presence of 0.10 μCi of [γ - ^{32}P]ATP for 30 min. Samples were then incubated for 30 min at 30°C with GST-Cdc14A or GST-Cdc14A(PD) (100 ng) in phosphatase buffer (20 mM Tris, pH 8.3, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 5 mM DTT) or with λ phosphatase (New England BioLabs) according to the manufacturer's instructions. Reactions were stopped by the addition of loading buffer and boiled for 5 min at 95°C. Proteins were resolved by SDS-PAGE and visualized by immunoblotting,

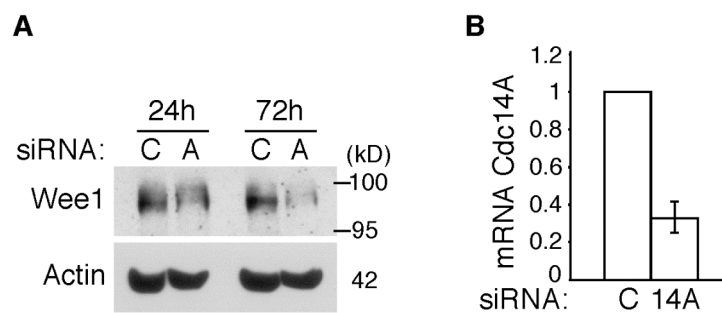
Coomassie staining, or autoradiography. Wee1 protein was immunoprecipitated with specific antibodies (anti-Wee1 or anti-HA) and was incubated for 40 min at 30°C with GST-Cdc14A, GST-Cdc14A(PD), or λ phosphatase. Reactions were stopped by the addition of loading buffer and boiled for 5 min at 95°C. Dephosphorylation was detected by immunoblotting with anti-total Wee1 antibodies or phosphospecific antibodies.

ACKNOWLEDGMENTS

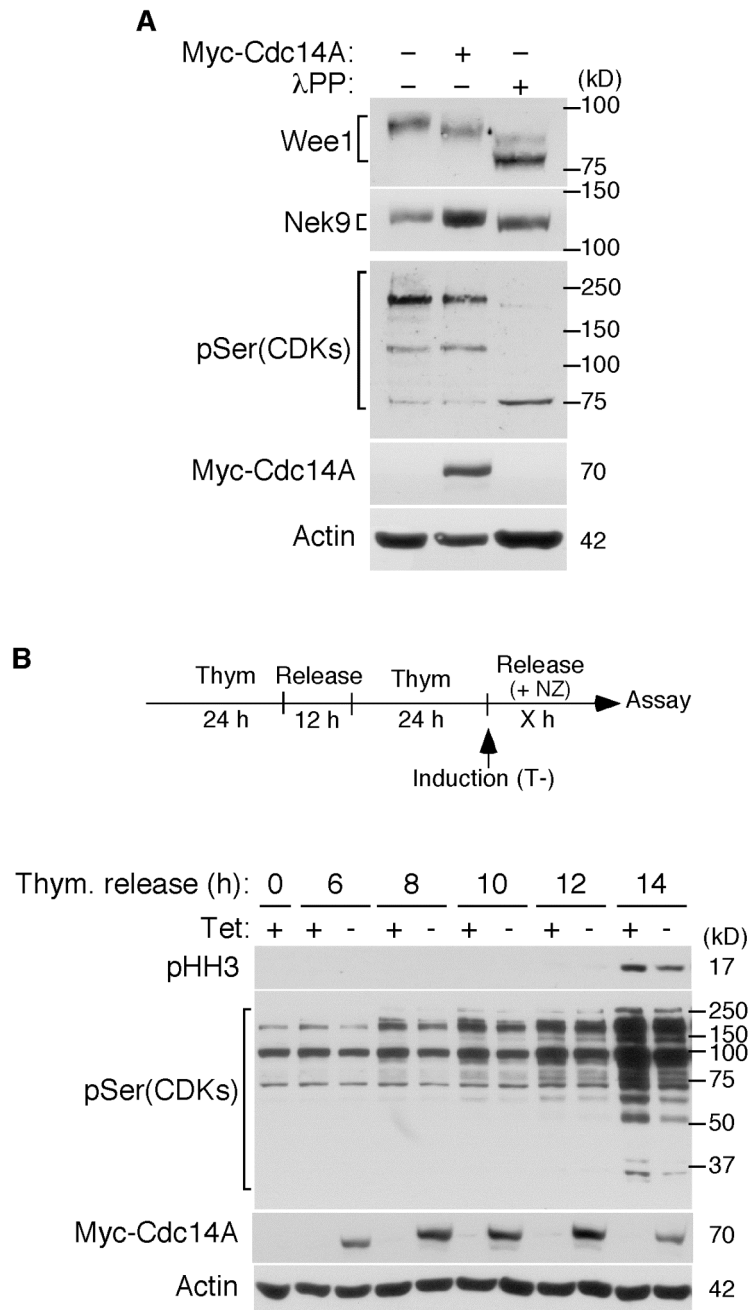
We thank E. Díaz and A. Pandiella (Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Salamanca, Spain) for their generous help in generating specific pSer-139(Wee1) antibody; S. Andrés for technical assistance; and the B05–B10 laboratories at the Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer for helpful discussions. This work was funded by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN; BFU2008-04293 and BFU2009-06938). S.O. was supported by a FPU fellowship from the Spanish Ministry of Education, and P.A. was supported by a JAE-Predoc fellowship from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

REFERENCES

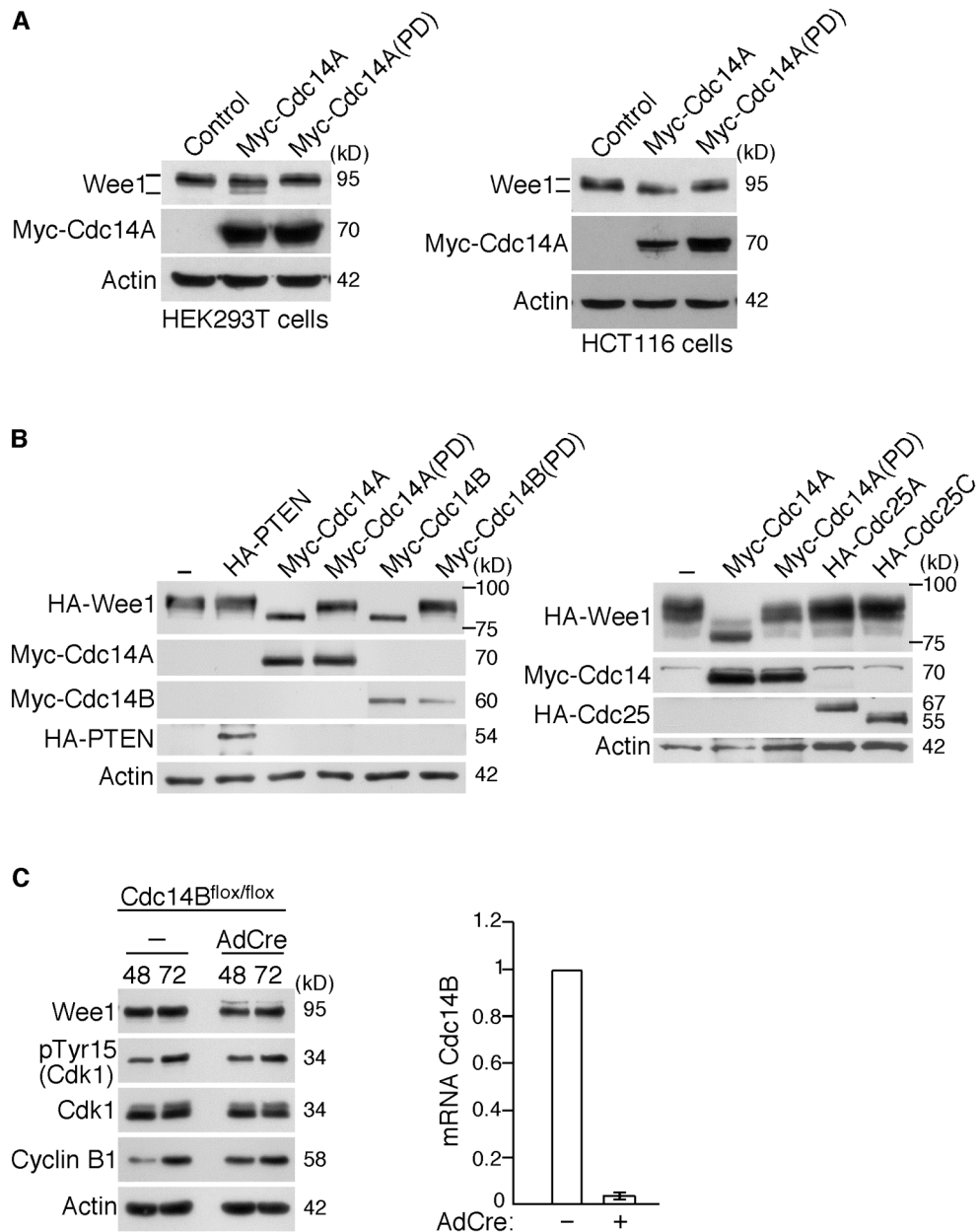
- Ayad NG, Rankin S, Murakami M, Jebanathirajah J, Gygi S, Kirschner MW (2003). Tome-1, a trigger of mitotic entry, is degraded during G1 via the APC. *Cell* 113, 101–113.
- Bassermann F, Frescas D, Guardavaccaro D, Busino L, Peschiaroli A, Pagano M (2008). The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. *Cell* 134, 256–267.
- Berdougo E, Nachury MV, Jackson PK, Jallepalli PV (2008). The nucleolar phosphatase Cdc14B is dispensable for chromosome segregation and mitotic exit in human cells. *Cell Cycle* 7, 1184–1190.
- Bertran MT, Sdelci S, Regue L, Avruch J, Caelles C, Roig J (2011). Nek9 is a Plk1-activated kinase that controls early centrosome separation through Nek6/7 and Eg5. *EMBO J* 30, 2634–2647.
- Bremner SC, Hall H, Martinez JS, Eissler CL, Hinrichsen TH, Rossie S, Parker LL, Hall MC, Charbonneau H (2011). Cdc14 phosphatases preferentially dephosphorylate a subset of cyclin-dependent kinase (Cdk) sites containing phosphoserine. *J Biol Chem* 287, 1662–1669.
- Chiesa M, Guillaumot M, Bueno MJ, Malumbres M (2011). The Cdc14B phosphatase displays oncogenic activity mediated by the Ras-Mek signaling pathway. *Cell Cycle* 10, 1607–1617.
- Clemente-Blanco A *et al.* (2011). Cdc14 phosphatase promotes segregation of telomeres through repression of RNA polymerase II transcription. *Nat Cell Biol* 13, 1450–1456.
- Díaz-Cuervo H, Bueno A (2008). Cds1 controls the release of Cdc14-like phosphatase Flp1 from the nucleolus to drive full activation of the checkpoint response to replication stress in fission yeast. *Mol Biol Cell* 19, 2488–2499.
- Esteban V, Blanco M, Cueille N, Simanis V, Moreno S, Bueno A (2004). A role for the Cdc14-family phosphatase Flp1p at the end of the cell cycle in controlling the rapid degradation of the mitotic inducer Cdc25p in fission yeast. *J Cell Sci* 117, 2461–2468.
- Esteban V, Sacristán M, Andrés S, Bueno A (2008). The Flp1/Clp1 phosphatase cooperates with HECT-type Pub1/2 protein-ubiquitin ligases in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Cycle* 7, 1269–1276.
- Guillaumot M, Manchado E, Chiesa M, Gómez-López G, Pisano DG, Sacristán MP, Malumbres M (2011). Cdc14b regulates mammalian RNA polymerase II and represses cell cycle transcription. *Sci Rep* 1, 189.
- 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.
- Kaiser BK, Zimmerman ZA, Charbonneau H, Jackson PK (2002). Disruption of centrosome structure, chromosome segregation, and cytokinesis by mis-expression of human Cdc14A phosphatase. *Mol Biol Cell* 13, 2289–2300.
- Katayama K, Fujita N, Tsuruo T (2005). Akt/protein kinase B-dependent phosphorylation and inactivation of WEE1Hu promote cell cycle progression at G2/M transition. *Mol Cell Biol* 25, 5725–5737.
- Krasinska L, de Bettignies G, Fisher D, Abrieu A, Fesquet D, Morin N (2007). Regulation of multiple cell cycle events by Cdc14 homologues in vertebrates. *Exp Cell Res* 313, 1225–1239.
- Li C, Andrade M, Dunbrack R, Enders GH (2010). A bifunctional regulatory element in human somatic Wee1 mediates cyclin A/Cdk2 binding and Crm1-dependent nuclear export. *Mol Cell Biol* 30, 116–130.
- Li L, Ernsting BR, Wishart MJ, Lohse DL, Dixon JE (1997). A family of putative tumor suppressors is structurally and functionally conserved in humans and yeast. *J Biol Chem* 272, 29403–29406.
- Mailand N, Lukas C, Kaiser BK, Jackson PK, Bartek J, Lukas J (2002). Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation. *Nat Cell Biol* 4, 317–322.
- McGowan CH, Russell P (1995). Cell cycle regulation of human WEE1. *EMBO J* 14, 2166–2175.
- Mocciaro A, Berdougo E, Zeng K, Black E, Vagnarelli P, Earnshaw W, Gillespie D, Jallepalli P, Schiebel E (2010). Vertebrate cells genetically deficient for Cdc14A or Cdc14B retain DNA damage checkpoint proficiency but are impaired in DNA repair. *J Cell Biol* 189, 631–639.
- Mocciaro A, Schiebel E (2010). Cdc14: a highly conserved family of phosphatases with non-conserved functions? *J Cell Sci* 123, 2867–2876.
- Mochida S, Ikeo S, Gannon J, Hunt T (2009). Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J* 28, 2777–2785.
- Mueller PR, Coleman TR, Dunphy WG (1995a). Cell cycle regulation of a *Xenopus* Wee1-like kinase. *Mol Biol Cell* 6, 119–134.
- Mueller PR, Coleman TR, Kumagai A, Dunphy WG (1995b). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 270, 86–90.
- Nigg EA (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17, 471–480.
- Nilsson I, Hoffmann I (2000). Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res* 4, 107–114.
- Okamoto K, Sagata N (2007). Mechanism for inactivation of the mitotic inhibitory kinase Wee1 at M phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 3753–3758.
- Owens L, Simanski S, Squire C, Smith A, Cartzendafner J, Cavett V, Caldwell Busby J, Sato T, Ayad NG (2010). Activation domain-dependent degradation of somatic Wee1 kinase. *J Biol Chem* 285, 6761–6769.
- Parker LL, Walter SA, Young PG, Piwnicka-Worms H (1993). Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor Wee1 by the nim1/cdr1 kinase. *Nature* 363, 736–738.
- Perry JA, Kornbluth S (2007). Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell Div* 2, 12.
- Queralt E, Uhlmann F (2008). Cdk-counteracting phosphatases unlock mitotic exit. *Curr Opin Cell Biol* 20, 661–668.
- Sacristán MP, Ovejero S, Bueno A (2011). Human Cdc14A becomes a cell cycle gene in controlling Cdk1 activity at the G/M transition. *Cell Cycle* 10, 387–391.
- Smith A, Simanski S, Fallahi M, Ayad NG (2007). Redundant ubiquitin ligase activities regulate wee1 degradation and mitotic entry. *Cell Cycle* 6, 2795–2799.
- Stegmeier F, Amon A (2004). Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annu Rev Genet* 38, 203–232.
- Tumurbaatar I, Cizmecioglu O, Hoffmann I, Grummt I, Voit R (2011). Human Cdc14B promotes progression through mitosis by dephosphorylating Cdc25 and regulating Cdk1/cyclin B activity. *PLoS One* 6, e14711.
- Vázquez-Novelle MD, Esteban V, Bueno A, Sacristán MP (2005). Functional homology among human and fission yeast Cdc14 phosphatases. *J Biol Chem* 280, 29144–29150.
- Vázquez-Novelle MD, Mailand N, Ovejero S, Bueno A, Sacristán MP (2010). Human Cdc14A phosphatase modulates the G2/M transition through Cdc25A and Cdc25B. *J Biol Chem* 285, 40544–40553.
- Watanabe N, Arai H, Iwasaki J, Shiina M, Ogata K, Hunter T, Osada H (2005). Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 11663–11668.
- Watanabe N, Arai H, Nishihara Y, Taniguchi M, Watanabe N, Hunter T, Osada H (2004). M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 4419–4424.
- Watanabe N, Broome M, Hunter T (1995). Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J* 14, 1878–1891.
- Wicky S, Tjandra H, Schieltz D, Yates J 3rd, Kellogg DR (2011). The Zds proteins control entry into mitosis and target protein phosphatase 2A to the Cdc25 phosphatase. *Mol Biol Cell* 22, 20–32.
- Wolfe BA, Gould KL (2004). Fission yeast Clp1p phosphatase affects G2/M transition and mitotic exit through Cdc25p inactivation. *EMBO J* 23, 919–929.
- Wu L, Russell P (1993). Nim1 kinase promotes mitosis by inactivating Wee1 tyrosine kinase. *Nature* 363, 738–741.



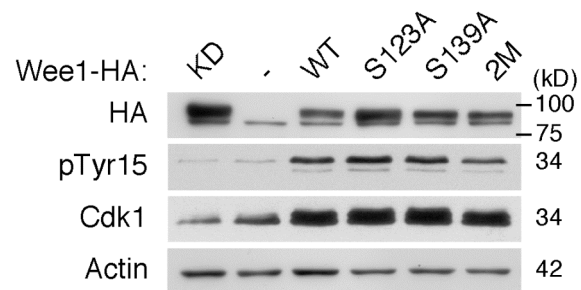
Supplementary Figure S1: (A) BJ-TERT cells were transfected with control (C) or Cdc14A siRNAs (A). After 24 and 72 hours of transfection, cellular extracts were obtained and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. (B) Cdc14A mRNA levels were analyzed at 72 hours after transfection using real-time PCR in triplicate measurements (\pm SD). The value given for Cdc14A mRNA in control cells was set as 1.



Supplementary Figure S2: (A) The U-2-OS-Myc-Cdc14A cell line was left untreated or induced to express wild-type Cdc14A for 24h. Cellular extracts were obtained and probed for the indicated antigens. Where indicated, 40ug of cellular extracts from non-induced cells were treated with λ phosphatase (λ PP). (B) U-2-OS-Myc-Cdc14A cells, synchronized at the G1/S transition by double thymidine treatment and released in the presence of nocodazole to trap cells in mitosis, were induced to express the transgene (as indicated by the top scheme) or kept non-induced (control conditions). Samples were taken for immunoblot analyses at the indicated time points after release. Note that overexpression of Cdc14A inhibits Cdk1 activity and delays entry into mitosis as measured by the level of Cdk1 phosphoepitopes, recognized by the pSer-(Cdk) substrate antibody, and p-Histone H3 signals.



Supplementary Figure S3: (A) HEK293T or HCT116 cells were transiently transfected with Myc-Cdc14A or Myc-Cdc14A(PD). After 48 hours of transfection, cellular extracts were obtained and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. (B) HEK293T cells expressing HA-Wee1 in combination with the indicated Myc- or HA-tagged phosphatases were harvested 40 hours after transfection, and cellular extracts were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. (C) Depletion of Cdc14B did not affect endogenous level of Wee1 protein. Asynchronously growing HCT116-Cdc14B^{flox/flox} cells were infected with an adenovirus expressing Cre recombinase (AdCre) to remove the cDNA encoding Cdc14B. Three days post-infection, cellular extracts were obtained and analyzed by immunoblotting against the indicated proteins. Cdc14B mRNA levels were analyzed using real-time PCR in triplicate measurements (\pm SD). The value given for Cdc14B mRNA in control cells (HCT116-Cdc14B^{flox/flox}) was set as 1.



Supplementary Figure S4: (A) HEK293T cells were transfected with the indicated HA-tagged Wee1 mutants. After 48 hours of transfection, cellular extracts were obtained and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies.