



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

“Participación de MPS1 en la amplificación de centrosomas mediada por HPV16-E7”

Tesis que presenta

M. EN C. Yair Eli Alfaro Mora

para obtener el Grado de

**Doctor en Ciencias**

en la Especialidad de

**Genética y Biología Molecular**

Directores de la Tesis

Dra. Rosa Ma. del Refugio Bermúdez Cruz

Dr. José de la luz Díaz Chávez

Ciudad de México

Julio, 2020

### **Agradecimientos**

Agradezco al Consejo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con número 168896 para la realización de este trabajo.

Agradezco a Laboratorio de Carcinogénesis de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer UNAM-INCAN por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

*A mis padres y hermanos.*

# Contenido

|  |    |
|--|----|
| <b>Resumen</b>   | 6  |
| <b>Abstract</b>  | 7  |
| <b>Introducción</b>  | 8  |
| Virus del papiloma humano (HPV) y su asociación con cáncer cervical                  | 8  |
| Infección de HPV en células epiteliales  | 9  |
| Genoma del HPV   | 11 |
| Proteínas del HPV  | 12 |
| <b>E1</b>  | 12 |
| <b>E2</b>  | 13 |
| <b>E4</b>  | 13 |
| <b>E5</b>  | 13 |
| <b>E6</b>  | 14 |
| <b>E7</b>  | 15 |
| Ganancia y pérdida de cromosomas   | 17 |
| Centrosomas  | 18 |
| <b>Preparación del procentriolo</b>  | 19 |
| <b>Estructura procentriolar</b>  | 19 |
| <b>Maduración de los centrosomas</b>   | 20 |
| MPS1   | 23 |
| Localización de MPS1 en centrosomas  | 25 |
| Degradación de MPS1  | 25 |
| Múltiples centrosomas y errores cromosómicos.  | 27 |
| HPVs y Centrosomas   | 27 |
| <b>Hipótesis</b>   | 29 |
| <b>Objetivo General</b>  | 29 |
| <b>Objetivos Particulares</b>  | 29 |
| <b>Materiales y Métodos</b>  | 29 |
| Cultivo celular y transfección   | 29 |
| Reaccion en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa reversa (qRT-PCR) | 30 |
| Extracción de Proteínas y Western blot   | 31 |
| Inmunofluorescencia  | 32 |
| Cuantificación de anomalías del centrosoma   | 33 |

|  |    |
|--|----|
| Análisis <i>in silico</i>  | 33 |
| Análisis estadístico   | 33 |
| <b>Resultados</b>  | 34 |
| La proteína E7 de HPV16 incrementa el transcrito y los niveles de proteína de MPS1       | 34 |
| HPV16-E7 promueve la amplificación del centrosoma  | 36 |
| El silenciamiento de MPS1 disminuye la amplificación del centrosoma mediada por HPV16-E7 | 37 |
| MPS1 y PLK4 podrían regularse mutuamente mediante fosforilación                          | 39 |
| <b>Discusión</b>   | 44 |
| <b>Conclusiones</b>  | 48 |
| <b>Bibliografía</b>  | 49 |

## **Resumen**

Se ha reportado que la oncoproteína E7 del papilomavirus humano tipo 16 (HPV16-E7) puede inducir una síntesis excesiva de centrosomas a través del incremento de la expresión de PLK4, el cual es un blanco transcripcional de E2F1. Por el otro lado, se ha reportado que el incremento en la estabilidad de la proteína MPS1 también puede generar una síntesis excesiva de centrosomas. En este trabajo, analizamos la posible participación de MPS1 en la amplificación de centrosomas mediado por HPV16-E7. Empleando técnicas como RT-qPCR, Western Blot e Inmunofluorescencia encontramos que E7 induce un incremento en el transcrito y los niveles de proteína de MPS1 en la línea celular U2OS. Además, observamos que la inhibición de la expresión de MPS1 en la línea celular U2OS que expresa a E7, induce una reducción significativa del número de centrosomas. Estos resultados indican que la presencia de la proteína MPS1 es necesaria para que E7 pueda inducir un incremento en el número de centrosomas.

## **Abstract**

It has been reported that the oncoprotein E7 from human papilloma virus type 16 (HPV16-E7) can induce the excessive synthesis of centrosomes through the increase in the expression of PLK4, which is a transcriptional target of E2F1. On the other hand, it has been reported that increasing MPS1 protein stability can also generate excessive synthesis of centrosomes. In this work, we analyzed the possible role of MPS1 in the amplification of centrosomes mediated by HPV16-E7. Employing RT-qPCR, Western Blot and Immunofluorescence techniques we found that E7 induces an increase in the MSP1 transcript and protein levels in the U2OS cell line. In addition, we observed that by inhibiting the expression of MPS1 in E7 protein expressing cells, it leads to a significant reduction in the number of centrosomes. These results indicate that the presence of the MPS1 protein is necessary for E7 protein to generate an increase in the number of centrosomes.

## Introducción

### **Virus del papiloma humano (HPV) y su asociación con cáncer cervical**

Los papilomavirus humanos son virus pequeños de DNA circular de doble cadena que pueden generar desde infecciones imperceptibles, lesiones benignas hiper-proliferativas en el epitelio cutáneo y mucoso llamadas verrugas o papilomas, hasta carcinomas malignos (1, 2). Cerca de 200 tipos de HPV han sido identificados en humanos, de los cuales aproximadamente 40 infectan la mucosa genital. Estos virus pueden ser clasificados en HPVs de alto o bajo riesgo.

Los HPVs tipo 6 y 11 son los más frecuentes dentro del grupo de bajo riesgo y generan cerca del 90% de las verrugas y papilomas respiratorios recurrentes (3-5). El grupo de alto riesgo está fuertemente asociado al cáncer cervico-uterino y ano genital (Steenbergen RD et al., 2005; Nair S; Pillai MR., 2005) así como a algunos tipos de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Ferris et al., 2005; Fakhary and Gillison 2006; Chen Ret al., 2005; Psyrrri A and DiMaio D., 2008).

Son 15 los diferentes tipos de papilomavirus reconocidos como de alto riesgo, de los cuales los tipos 16 y 18 son detectados en aproximadamente 70% de todos los cánceres cervicales a nivel mundial (3, 4). Estos tipos de virus tienen como principal blanco la zona de transformación, la cual es parte del tracto genital inferior femenino y es definida como una entidad dinámica formada durante la pubertad, compuesta por un epitelio escamoso-columnar en continuidad y/o un epitelio escamoso con glándulas subyacentes (6, 7).

El cáncer cervico-uterino permanece como la segunda causa de muerte más común en mujeres, diagnosticándose cada año aproximadamente 500,000 casos nuevos en todo el mundo con una mortalidad de aproximadamente una tercera parte de esta cifra. Para afrontar esta problemática, recientemente se han desarrollado vacunas que bloquean la infección inicial de los tipos HPV16 y HPV18. Sin embargo, estas vacunas no previenen tanto la infección de los otros tipos de papilomavirus que ocasionan el 30% restante de los tipos de



cáncer asociados a HPV como la progresión hacia cáncer cervico-uterino en pacientes infectados previamente (5).

Aun cuando los papilomavirus de alto riesgo son los agentes causantes del carcinoma cervical, la infección por sí misma no es suficiente para el desarrollo directo del cáncer, es necesaria la contribución de otros factores ambientales así como la acumulación de alteraciones genéticas adicionales las cuales pueden obtenerse tras una infección persistente como la integración del genoma viral en el genoma de la célula hospedera, generando una expresión constante de las oncoproteínas virales (8).

### **Infección de HPV en células epiteliales**

La infección de los papilomavirus se da exclusivamente en queratinocitos, siguiendo una expresión génica diferencial tanto espacial como temporal en el epitelio infectado (3). El virus se dirige hacia las células de la capa basal del epitelio a través de micro-abrasiones presentes en el tejido, facilitando su interacción con componentes celulares como la proteína de matriz extracelular específica de queratinocitos laminina 5, receptores proteoglicanos heparan-sulfato, y/o el receptor  $\alpha 6$  integrina (2, 4, 9-12).

En la capa basal residen células madre y células transitorias de amplificación las cuales se dividen continuamente para sustituir a las células que se pierden en el estrato superior por descamación. Después de dividirse una célula de la capa basal, una célula permanece anclada mientras que la otra célula, derivada de la mitosis, migra hacia estratos supra basales en donde se activara el programa de diferenciación celular terminal. Durante este proceso de diferenciación, la célula sale del ciclo celular perdiendo tanto la habilidad de dividirse como la integridad de su núcleo (2, 4, 9, 13).

Los viriones entran a las células de la capa basal por endocitosis mediada por clatrina o claveolas (14). La unión del virión con la superficie celular ocasiona un cambio conformacional

en la cápside permitiendo que el amino terminal de la proteína L2 (proteína presente en menor proporción en la cápside) pueda ser escindido por la proteasa furina, ya sea en la superficie celular o dentro del compartimiento endosomal. Después de este procesamiento enzimático, la cápside comienza a desenvolverse liberando un complejo L2-Genoma Viral (L2-GV). El carboxilo terminal de L2 permeabiliza la membrana del endosoma, liberando a L2-GV hacia el citosol de la célula. En el citosol, la chaperona Hsp70 se une en el carboxilo terminal de L2 translocando el complejo L2-GV hacia el núcleo a través de la Señal de Localización Nuclear (NLS) presente en L2 (4, 15-17). Cuando el genoma viral entra al núcleo, la proteína L2 dirige el genoma viral hacia acumulaciones proteínicas inter-cromosomales conocidas como Dominio Nuclear 10 (DN10). Estos dominios contienen numerosas proteínas incluyendo a la Proteína de Leucemia Promielocítica (PLM), SP100, y Daxx, son transcripcionalmente activos, y promueven la transcripción temprana del RNA viral (18, 19). El genoma viral se mantiene en el núcleo de la célula basal infectada en forma de elementos replicantes extra-cromosomales, amplificándose en promedio de 50 a 100 copias en sincronía con el ciclo celular. (2, 4, 9, 19). Así, después de dividirse, cada célula resultante contiene una serie de copias virales, lo cual asegura una infección sostenible y persistente.

Por otro lado, en queratinocitos diferenciados infectados presentes en estratos suprabasales, el genoma viral se integra en regiones del genoma de la célula llamadas zonas frágiles. Esta integración ocasiona que solo se expresen los oncogenes virales E6 y E7 causando la estabilización de su Ácido RiboNucleico mensajero (mRNA) y la interrupción el programa de diferenciación de los queratinocitos al mantener una fase S del ciclo celular sostenida, incrementando la amplificación del genoma viral y generando la expresión de los genes tardíos que codifican la cápside para el posterior ensamblaje del virión (2, 3, 20).

## **Genoma del HPV**

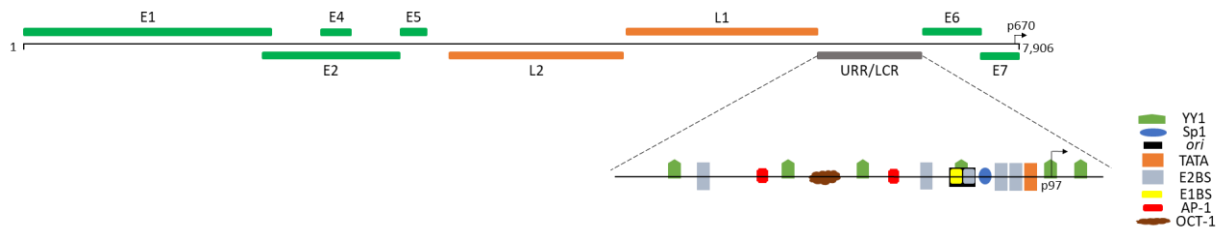
El virus de papiloma humano es un virus pequeño no envuelto, posee una cápside icosaédrica de 50-52 nm de diámetro en donde, en conjunto con histonas celulares y formando estructuras semejantes a la cromatina, alberga un genoma de DNA circular cerrado de doble cadena de aproximadamente 8 Kb. El genoma viral se replica dentro del núcleo de la célula hospedera y contienen ocho marcos de lectura abiertos (ORFs) clasificados en genes tempranos y tardíos (Figura 1). Estos genes están separados por una región no codificante denominada Región Reguladora Rio Arriba (URR) o Región Larga de Control (LCR) ubicada entre el 5' y el 3' de los genes L1 y E6 respectivamente. La URR contiene varios sitios regulatorios como el origen de replicación viral (Ori) el cual esta embebido en la región de control transcripcional del promotor temprano, elementos regulatorios como la caja TATA y sitios de unión a factores de transcripción como YY1, SP1, AP-1, OCT-1,TEF-1 además de C/EBP, un potenciador transcripcional que es activo solo en células epiteliales; un sitio de unión a la proteína E1 (E1BS) y cuatro sitios de unión a la proteína E2 (E2BS, Figura 1) (4, 9, 21-23).

El DNA del papilomavirus es transcrito como un mRNA policistrónico a partir de la transcripción de una sola cadena de DNA viral. Los transcritos virales son procesados diferencialmente mediante mecanismos de corte y empalme y escisión del mRNA policistrónico para generar las distintas proteínas virales (4, 21).

Los ORFs tardíos codifican a las proteínas principal L1 y secundaria L2 que conforman la cápside icosaédrica viral. Estos genes son expresados a partir de la activación del segundo promotor o promotor tardío, de manera dependiente a la diferenciación de la célula hospedera. La proteína L1 es capaz de auto ensamblarse mientras que la proteína L2 empaca el genoma viral dentro de la cápside (2, 4).

Los ORFs tempranos codifican a seis proteínas denominadas E1, E2, E4, E5, E6, y E7, las cuales son necesarias para la replicación del genoma viral. La transcripción de estos genes

es iniciada por un promotor temprano ubicado rio arriba del ORF E6 y su activación es independiente de la diferenciación de la célula hospedera (4, 9, 21).



**Figura 1. Representación del genoma viral de HPV16.** El genoma de HPV16 se compone de 7,906 pares de bases y se muestra en forma linealizada con los promotores temprano (p97) y tardío (p670) marcados con flechas. Los seis genes tempranos (verde) junto con los genes tardíos (naranja) se expresan en distintas etapas de la diferenciación celular. Dentro de la región larga de control (URR/LCR) se encuentra el origen de replicación, así como varios elementos regulatorios de la expresión de los genes virales, como motivos de unión a factores de transcripción y a proteínas propias del HPV16.

## Proteínas del HPV

Las proteínas E1 y E2 son las primeras en ser sintetizadas, forman un complejo con el origen de replicación viral y reclutan polimerasas y proteínas accesorias celulares para iniciar la replicación basal del genoma viral (4, 9, 21, 24).

### E1

La proteína E1 es una fosfoproteína nuclear con actividad de helicasa de aproximadamente 68 kilodalton (kDa) con cuatro dominios: un dominio amino terminal, un dominio de unión a secuencias específicas de DNA, un dominio de oligomerización, y un dominio carboxilo terminal con actividad helicasa dependiente de ATP. La proteína E1 se une a un sitio llamado E1BS presente en el Ori, el cual es una secuencia palindrómica imperfecta de 18 pares de bases (pb) con una secuencia consenso ATTGTT doble, separados por tres nucleótidos y es parcialmente conservada entre varios tipos de HPV. Estando unida a E1BS, E1 desenrolla bidireccionalmente esta región, recluta a la polimerasa  $\alpha$ , y, junto con la proteína viral E2,

forma por duplicado una estructura anillar trimérica denominada complejo de replicación (2, 22, 24, 25).

## **E2**

La proteína E2, es una fosfoproteína nuclear de aproximadamente 48 kDa, es activa al formar dímeros con otra proteína E2 a través de la unión carboxilo terminal-carboxilo terminal. Se ha observado que se une a una secuencia palindrómica conservada ACCN<sub>6</sub>GGT presente en el Ori llamada E2BS, interacciona con proteínas de la maquinaria de transcripción como la proteína de unión a la caja TATA (TBP) y el factor de transcripción IIB (TFIIB), recluta a la proteína E1 al Ori y reprime la transcripción de las proteínas virales E6 y E7 debido a la unión de E2 al E2BS la cual se encuentra proximal al promotor de E6 y E7 (2, 4, 22-25).

## **E4**

La proteína E4 es sintetizada en queratinocitos presentes en estratos superiores por corte y empalme del mRNA transcrito de los ORFs de E1 y E4. Se ha observado que E4 induce un arresto celular en la fase G2 del ciclo celular al secuestrar el complejo ciclina B1-CDK1 y genera el colapso del citoesqueleto de queratina de la célula hospedera, comprometiendo la integridad celular y facilitando la liberación del virus (26).

## **E5**

Las proteínas E5, E6, y E7 de los HPVs de alto riesgo son consideradas oncogénicas debido a que son capaces de estimular la progresión del ciclo celular y retrasar el programa de diferenciación terminal (5). E5 es una proteína compuesta por 83 aminoácidos (aa) y un peso de 10 kDa, posee tres dominios hidrofóbicos bien definidos ubicados en la región amino terminal, central, y carboxilo terminal. Su naturaleza hidrófoba le permite interactuar y modular diversas proteínas de membrana plasmática, del aparato de Golgi, del retículo endoplasmático, y de la envoltura nuclear. Una de las proteínas blanco de E5 es el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR). La proteína E5 aumenta el número de este tipo de receptores en la superficie celular al inducir una disminución de su internalización, un

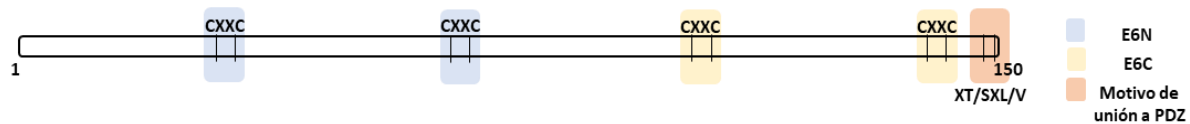
aumento en su reciclaje, y al evitar su degradación al interactuar con la E3 ubiquitin ligasa c-Cbl. Estos eventos promueven una activación prolongada de EGFR y el incremento de sus señales efectoras como la activación de la vía de las protein-cinasas activadas por mitógeno/cinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (MAPK/ERK1/2), la sobreexpresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el aumento de la síntesis de DNA al disminuir la expresión del inhibidor de ciclinas dependientes de cinasas (CDK) p27/Kip1, la disminución de la transcripción de p21 vía c-jun, y la reducción en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) I y II y del antígeno leucocitario humano I (HLA-I) (21, 27-29). La alteración de todas estas vías de señalización favorece la generación de un fenotipo maligno y la evasión de la respuesta inmune ante las células infectadas.

## **E6**

Las proteínas E6 y E7 son las responsables de la principal actividad transformante de los HPVs de alto riesgo debido a que pueden unirse y modular a una gran cantidad de proteínas (20, 28, 30). E6 es una proteína que está conformada por 150/160 aminoácidos en donde se encuentran dos dominios de unión a Zn formados por cuatro motivos CXXC denominados E6N y E6C, y un motivo de unión a dominios PDZ (Figura 2). El motivo de unión a PDZ le confiere a E6 la capacidad de unirse y degradar a múltiples proteínas que poseen un dominio PDZ, las cuales están involucradas en la polaridad celular, el ensamble de la unión estrecha, y la progresión del ciclo celular (31-34). Los dominios de unión a Zn le confieren a E6 la capacidad de unir y modular a una gran cantidad de proteínas celulares que posee motivos de unión LXXLL como el factor 3 de regulación del interferon (IRF3) (35), Tuberina (36, 37), la proteína pro apoptótica BAK (38), la proteína de unión a E6 (E6BP) (37, 39), y la proteína asociada a E6 (E6AP) (37, 40) .

La unión de E6 con p53 es la interacción proteica más estudiada de esta oncoproteína. E6 se une y degrada a la proteína supresora de tumores p53 a través de la unión con el motivo

LXXLL presente en el dominio N-terminal de reconocimiento de sustrato de la E3 ubiquitin ligasa E6AP. La formación de este dímero genera un aumento por la afinidad de E6AP por p53 formando el complejo trimérico E6-E6AP-p53 el cual marca a p53 hacia degradación por ubiquitinación via proteasoma 26S (41-44).



**Figura 2. Estructura de la Proteína E6 de HPV de alto riesgo.** Representación lineal de la proteína E6. La proteína E6 está compuesta por 150 aminoácidos, posee cuatro motivos CXXC de unión a zinc denominados E6N y E6C, debido a su localización en el N-terminal y el C-terminal, respectivamente. Estos motivos están involucrados en la dimerización de la proteína y la interacción con distintos blancos celulares. En el C- terminal de E6 de varios tipos de HPV de alto riesgo se encuentra un motivo de unión a dominios PDZ.

## E7

La oncoproteína E7 está conformada por 100 aminoácidos y contiene tres regiones conservadas denominadas CR1, CR2 y CR3. Dentro del dominio CR3 de E7 se encuentra localizado un sitio de unión a zinc (Zn), compuesto por dos motivos CXXC separados entre sí por 29/30 aminoácidos los cuales son necesarios para la formación de heterodímeros y para mediar la interacción con proteínas como p21 y pRB (Figura 3) (45-47). El dominio CR3 contribuye a la actividad transformante de E7 al promover la interacción directa con múltiples proteínas celulares como la unión a la ubiquitin ligasa Cullina 2 y el C-terminal de pRB para marcar a esta última a degradación (48-50), la unión en el c-terminal y posterior inactivación de los inhibidores de ciclinas dependientes de cinasas p27 y p21 (51, 52), así como la unión a la proteína de unión a la caja TATA (53), a los factores de transcripción E2F (54) y AP-1 (55), y a la acetiltransferasa p300/CBP (pCAF) (56).

E7 posee un motivo de unión LXCXEX presente en el dominio CR2, con el cual interacciona con diversas proteínas como ciclina A, ciclina E, la cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2), y la familia de proteínas de bolsillo: Retinoblastoma (pRb), p107 y p130 (57-60). La unión de E7

con pRb inhibe la unión inhibitoria de pRB con el factor de transcripción E2F. Este factor de transcripción se libera de pRB favoreciendo la expresión de genes necesarios para la replicación de DNA, ocasionando que la célula infectada entre a la fase S del ciclo celular de manera sostenida y no programada (60, 61).



**Figura 3. Estructura de la proteína E7 de HPV de alto riesgo.** Representación lineal de la proteína E. La proteína E7 está compuesta por 100 aminoácidos los cuales no muestran similitudes en su secuencia con proteínas celulares. El amino terminal de la proteína posee tres dominios conservados denominados CR1, CR2 y CR3. Dentro del dominio CR2 se encuentra un motivo de unión LXCXE el cual interacciona con la familia de proteínas pRB y un sitio de fosforilación (aminoácidos 31/32) mediado por la cinasa caseína II (CKII). Dentro del dominio CR1 se encuentran dos motivos de unión a zinc CXXC el cual está involucrado en la dimerización de la proteína y la interacción con distintos blancos celulares.

Este evento llevaría a la célula hospedera hacia apoptosis por la acción de p53, sin embargo, la proteína E6 se une y marca a degradación a p53. De esta manera se elimina la dependencia del ciclo celular para la replicación del genoma viral, se retrasa el programa de diferenciación de los queratinocitos al permitir un estado mitótico activo en las células que migran a estratos supra basales, se generan defectos en el monitoreo del huso mitótico, se pierde el control del crecimiento celular, se pueden acumular mutaciones, generar aneuploidía e inestabilidad genómica debido al daño del DNA por la degradación de p53 y eventualmente generar un fenotipo de malignidad (2, 4, 5, 8, 9, 20, 62). En la tabla 1 se muestran algunos de los blancos moleculares de la proteína E7 de HPV de alto riesgo.

**Tabla 1. Blancos moleculares de la proteína E7 de HPV de alto riesgo.** Se muestran algunos blancos moleculares y el efecto que tiene la oncoproteína de E7 de HPV de alto riesgo.

| Blanco molecular | Descripción   |
|------------------|---|
| PCNA             | Inducción del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (63) |



|                       |   |
|-----------------------|---|
| p21 <sup>Cip1</sup>   | Asociación con P21 <sup>Cip1</sup> liberando a CDK2 (52)  |
| p27 <sup>KIP1</sup>   | Unión e inactivación de p27 <sup>KIP1</sup> (64)  |
| IGFBP-3               | Unión e inhibición de apoptosis inducida por la proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (65) |
| ciclina E/A-CDK2-p107 | Fosforilación de p1076 a través de ciclina E/A-CDK2 (58)  |
| E2F2                  | Incremento en la expresión de E2F2 (66)   |
| AP1                   | Unión y transactivación con factores de transcripción de la familia AP1 (55)  |
| p600                  | Interacción con el factor asociado a pRb p600 (67)  |
| p300                  | Interacción con el coactivador transcripcional p300 y regulación de la actividad transcripcional de E2 (68)             |
| hTid-1                | Interacción con la chaperona hTid-1 (69)  |
| BRG-1                 | Interacción e inhibición de la represión del promotor c-fos (70)  |
| TATA                  | Interacción y desregulación transcripcional de la proteína de unión a la caja TATA (53, 71, 72)                         |
| Mi2beta               | Unión al complejo histona deacetilasa (73)  |
| piruvato cinasa M2    | Interacción y alteración de la síntesis de ácidos nucleicos (74)  |

### **Ganancia y pérdida de cromosomas**

Al generarse perturbaciones durante la replicación del DNA y/o durante la mitosis, se puede obtener una ganancia o pérdida de uno o más cromosomas. Este fenómeno se denomina aneuploidía. Estas células aneuploides pueden presentar cambios constantes en la cantidad de cromosomas ganados o perdidos obteniendo un estado de inestabilidad cromosómica. Algunas células que adquieren inestabilidad cromosómica no son viables, sin embargo, pueden llegar a sobrevivir debido a la expresión, silenciamiento, y/o mutación de los oncogenes o genes supresores de tumores presentes en el número de copias de genes adquiridos o perdidos, obteniendo ventajas en el crecimiento, generando metástasis, y aumentando la sobrevivencia de este tipo de células (75, 76). Dentro de los errores en el

proceso mitótico, las alteraciones en el ciclo normal de duplicación de los centrosomas juegan un papel importante.

## **Centrosomas**

Los centrosomas son estructuras conservadas en células eucarióticas. Son el principal centro de organización de microtúbulos y son responsables de organizar y nuclear los microtúbulos del citoesqueleto, la formación del huso mitótico, el transporte de organelos, así como la polaridad y movilidad celular. Los centrosomas están compuestos por un par de centriolos los cuales son estructuras cilíndricas polarizadas conformadas por nueve conjuntos de microtúbulos organizados simétricamente en forma radial, tienen un tamaño aproximado de 130 nm de diámetro interno, 250 nm de diámetro externo y 450 nm de longitud, y se encuentran rodeados por una matriz pericentriolar (MPC) responsable de la nucleación de microtúbulos (77-79). Cada centriolo se diferencia uno del otro debido a la presencia de estructuras adicionales presentes en la superficie de cada centriolo. El centriolo principal (el cual es referido alternamente como “materno”) posee dos tipos de extensiones llamados apéndices distales y subdistales, diferenciándose de esta forma del centriolo secundario (referido alternamente como “hijo”). Los apéndices distales están asociados con un solo triplete de microtúbulos por lo que siempre se encontrarán nueve apéndices distales por centriolo primario y se encuentran localizados de manera central y simétricamente en la parte distal del centriolo primario (80). Los apéndices subdistales varían en número, grosor y distribución entre cada centrosoma, asociándose con 2-3 tripletes de microtúbulos del centriolo (80).

En condiciones normales, los centriolos se duplican, de manera canónica, solamente una ocasión por ciclo celular de manera semiconservativa (Figura 4). Esto asegura la presencia de dos centrosomas los cuales promoverán el ensamble del huso mitótico bipolar para la segregación de cromosomas en la división celular (81-84).

### **Preparación del procentriolo**

Durante la transición del ciclo celular G1/S se genera la localización de Cep295 en el extremo proximal de los centriolos, la cual funge como plataforma de ensamblaje de procentriolos permitiendo el reclutamiento de la proteína Cep192 y el posterior reclutamiento del complejo proteico Cep57-Cep63-Cep152 (85, 86). Este complejo, junto con Cep192, reclutan a la cinasa PLK4 (87, 88), en donde PLK4 se autofosforila en el dominio cinsasa, promoviendo su propia actividad (89-91) y reclutando hacia el centrosoma a la proteína STIL en donde será fosforilada por PLK4. La unión y fosforilación de STIL por parte de PLK4 protege a PLK4 de degradación y facilita la interacción directa entre el motivo de unión denominado STAN el cual está presente en STIL y la proteína HsSAS-6 (92, 93).

### **Estructura procentriolar**

La presencia de STIL y HsSAS6 en el centrosoma genera el reclutamiento de la proteína CPAP (94), evento que dará inicio a el ensamble de una estructura parecida a la rueda de una carreta de aproximadamente 22nm de diámetro (95). La rueda de carreta está conformada por la oligomerización de los dominios amino terminal de dímeros de HsSAS6, los cuales generan la formación de un anillo simétrico conformando por nueve dímeros de HsSAS6, la cual servirá de templado para dar origen al procentriolo (96, 97). Se ha observado que la conexión entre la estructura en forma de rueda de carreta y los nueve tripletes de microtúbulos que conforman al procentriolo está mediada por la formación de estructuras denominadas cabezas de alfiler. En *Chlamydomonas* se ha observado que la proteína homóloga Bld10p se encuentra en los extremos exteriores de la rueda de carreta (98), mientras que en células humanas la proteína Cep135 interactúa con HsSAS6 mediante su C-terminal y con los microtúbulos a través de su amino terminal (99-101). Los nueve tripletes de microtúbulos comienzan a añadirse y a elongar cuando la estructura de carreta y las cabezas de alfiler están ensamblados. La longitud de la elongación del procentriolo la regulan las proteínas CPAP, Cep97, Cep120, Kif24, POC1, POC5, OFD1, CP110, Spice 1, USP33, centrobina y

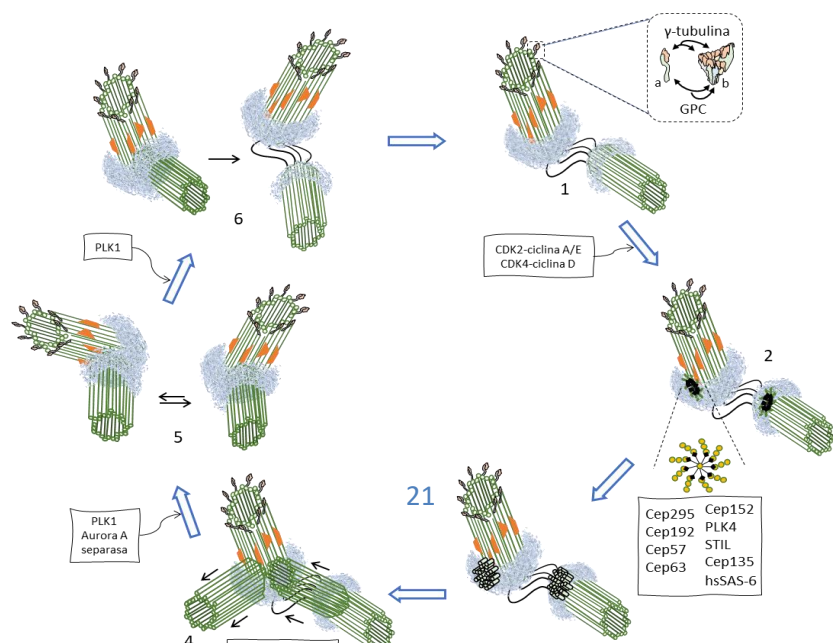
dímeros de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina ya que la sobreexpresión y/o delección de estas proteínas genera centriolos prolongados (102-115). Además, se ha observado que es necesaria la fosforilación de PLK2 en los residuos S589 y S595 presentes en la proteína CPAP para que los procentriolos puedan elongarse (116).

### **Maduración de los centrosomas**

La matriz de proteínas que rodea a los centriolos se denomina material pericentriolar (PCM). Esta matriz está compuesta por aproximadamente 100 proteínas diferentes. En la actualidad, el reclutamiento y la organización de las proteínas que conforman el PCM está pobremente elucidado. La actividad de las cinasas PLK1 y Aurora A es necesaria para iniciar el reclutamiento de PCM, el cual debe de incrementar en volumen para poder nuclear un gran número de microtúbulos, proceso que se denomina maduración del centrosoma. La proteína Cep57 se encuentra localizada en la pared proximal del centriolo primario en donde interacciona con el dominio PACT de la proteína Pericentrina. Se ha observado que esta unión regula la organización del PCM (117). Por otro lado, la fosforilación de Pericentrina por PLK1 sirve como proteína de andamiaje para otras proteínas (118). Por ejemplo: se ha observado que interactúa con la proteína 2 y 3 del complejo  $\gamma$ -tubulina (GPC2 y GCP3, respectivamente) las cuales integran el complejo anillo de  $\gamma$ -tubulina ( $\gamma$ -TURC) presentes en el PCM (119). Estos complejos  $\gamma$ -TuRC son estructuras en forma de anillo de diámetro aproximado de 32 nm, una altura aproximada de 25 nm, y un peso aproximado de 2.2 megadaltons (mDa) en donde se nuclearán los microtúbulos debido a su gran afinidad de los dímeros de  $\alpha\beta$ -tubulina y  $\gamma$ -tubulina. Cada anillo está conformado a su vez por 14 complejos pequeños de  $\gamma$ -tubulina ( $\gamma$ -TuSC) con arreglo en espiral con giro hacia la izquierda. Los complejos  $\gamma$ -TuSC tienen un peso aproximadamente de 300 kDa y están compuestos por una molécula de  $\gamma$ -tubulina y una molécula GPC (120, 121). Los complejos  $\gamma$ -TuRC son reclutados hacia el centrosoma por varias proteínas como NEDD1 (122-125), Cep192 (126-128), Cep215 (128-130) y Nlp (131, 132), las cuales son fosforiladas por PLK1 Y CDK1.

Posteriormente, el procentriolo ensamblado de manera ortogonal sobre el extremo proximal del centriolo que se utilizó como templado, es separado mediante la actividad de la cinasa PLK1 y la proteasa separasa (83, 133-135). Este paso es necesario para poder nuclear un procentriolo en el siguiente ciclo de duplicación del centrosoma y el posterior reclutamiento de la proteína centrosomal 295 (Cep295) hacia el extremo proximal de los centriolos (86).

La duplicación del centrosoma descrita anteriormente ocurre en coordinación con la síntesis del DNA, iniciándose al activarse cinasas serina/treonina conocidas como ciclinas dependientes de cinasas (CDKs). Estas CDKs son reguladas por su asociación con otras proteínas llamadas ciclinas, las cuales son expresadas en diferentes etapas del ciclo celular. Se ha reportado que la actividad de los complejos CDK2/Ciclina E y CDK2/Ciclina A son necesarias para iniciar la duplicación del centrosoma (136, 137). Sin embargo, los sustratos de estas cinasas que permiten el inicio de la duplicación de centrosomas no han sido definidos totalmente, reportándose algunas proteínas implicadas en el inicio de la duplicación de centrosomas (138-140). Una de estas proteínas es la proteína del huso monopolar 1 (MPS1).



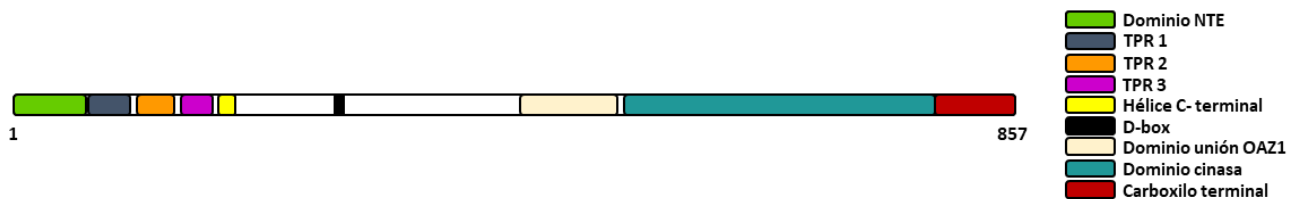
**Figura 4. Ciclo de duplicación del centrosoma.** La duplicación canónica del centrosoma emplea los centriolos desacoplados existentes como templados para sintetizar un par de centriolos nuevo (1), que se originan de manera ortogonal respecto a cada centriolo a partir de una estructura denominada “rueda de carreta”, la cual se ensamblará a partir del reclutamiento de varias proteínas (2). Esta estructura permitirá el reclutamiento de varias proteínas y el ensamble de microtúbulos los cuales formarán un procentriolo (3) el cual se elongarán para dar forma a los centriolos (4). Cuando el centriolo se ha sintetizado, se inicia la maduración de los nuevos centrosomas por medio de la acción de cinasas como PLK1 y Aurora A, acumulando material pericentriolar, se adquieren apéndices distales y proximales en el nuevo centriolo primario, y se escinden las fibras flexibles de C-NAP1 que mantienen unidos a los centriolos molde. Posteriormente, cada centriolo migra hacia extremos opuestos para la formación del huso mitótico (5). Al finalizar la mitosis, el centrosoma tiene dos centriolos anclados los cuales necesitan separarse para poder iniciar una nueva ronda de síntesis del centrosoma 6. Magnificación del complejo anillar de tubulina (una molécula de proteína de complejo de  $\gamma$ -tubulina y una molécula de  $\gamma$ -tubulina ( $\gamma$ -TuSC, 1a). La unión de 14 complejos  $\gamma$ -TuSC forma el anillo de  $\gamma$ -tubulina ( $\gamma$ -TuRC, 1b) los cuales se encuentran en los apéndices distales del centriolo primario, de la estructura en forma de carreta (2). En los recuadros se ejemplifican algunas proteínas involucradas en cada paso del ciclo de duplicación del centrosoma.

## MPS1

El producto del gen MPS1 fue descrito por primera vez en mutantes de levaduras que presentaban defectos en la duplicación del cuerpo polar del huso, generando husos monopolares durante la división celular (141). En humanos, esta proteína se describió como una treonina cinasa seleccionada por fosfotirosina (PYT) (142) y como treonina y tirosina cinasa (TTK) (143) empleando anticuerpos anti fosfotirosina para su detección. MPS1 tiene un peso aproximado de 90 kDa y posee un dominio cinasa conservado en el carboxilo terminal el cual es capaz de fosforilar residuos de serina/treonina y tirosina. Esta capacidad de fosforilar estos tres residuos cataloga a MPS1 como una cinasa de doble especificidad (144). Sin

embargo, actualmente no se conocen sustratos fosforilados por MPS1 en residuos de tirosinas que tengan alguna actividad biológica relevante. En la región amino terminal de MPS1 se localizan 5 dominios diferentes: una Extensión N-Terminal (NTE, aminoácidos 1-61), tres repetidos tetratricopeptídicos con una séptima hélice que cubre a los TPR denominada hélice-C (TPR, aminoácidos 62-192), y un motivo conservado denominado Extensión C-terminal (CTE, aminoácidos 193-300, Figura 5). Estos dominios modulan la localización subcelular de MPS1 entre cinetocoros y centrosoma (145-149). KMN es un complejo proteico involucrado en la formación del huso mitótico que se encuentra en el cinetocoro de las cromátidas hermanas y se conforma por los complejos Knl1c, Mis12c, y Ndc80c. En humanos, Ndc80 es un hetero-tetrámero compuesto por las proteínas HEC1, Nuf2, Spc24, y Spc25, las cuales forman sub-dímeros entre HEC1-Nuf2 y Spc24-Spc25 (150-152). Los sub-dímeros Hec1-Nuf2 contienen dominios homólogos a calponina (HC) los cuales son sitios de unión a MPS1. Estos dominios se encuentran auto-inhibidos por el amino terminal de Hec1. Mediante la fosforilación del amino terminal de Hec1 mediada por la cinasa Aurora B, estos residuos son liberados de su inhibición e incrementan el reclutamiento de MPS1 hacia el complejo Ndc80, uniéndose el dominio NTE de MPS1 con el dominio CH presente en Hec1 mientras que la extensión C-terminal de MPS1 se une directamente con el dominio Ch presente en Nuf2 (146, 147, 153, 154). De manera interesante, se ha observado que el dominio NTE (aminoácidos 13-27) localiza a MPS1 hacia el cinetocoro y que los dominios TPR adyacentes (TPR1 y TPR2) se unen de manera directa con el complejo Ndc80c. Sin embargo, se ha observado que el dominio cinasa (aminoácidos 516-792) y carboxilo terminal (CT, aminoácidos 793-857, Figura 5) son los residuos de MPS1 que contribuyen con la mayor localización de MPS1 hacia el cinetocoro, siendo el CT el principal residuo que orquesta la homo-dimerización de MPS1 (148). Estando presente en el cinetocoro, MPS1 se activa mediante una autofosforilación en el residuo T676 (148, 155-157). Esta fosforilación ocasiona que MPS1 logre alcanzar su máxima actividad cinasa en el cinetocoro fosforilando a la proteína Knl1c en múltiples

secuencias repetidas MELT (Metionina-Ácido Glutámico-Leucina-Treonina) (158), promoviendo el reclutamiento jerárquico e unión de las proteínas BUB3, BUB1, BUBR1, MAD1, MAD2 y Cdc20 las cuales forman parte del complejo del punto de monitoreo mitótico (MCC) (159-164). De esta forma, MPS1 participa en el monitoreo del correcto anclaje de microtúbulos en el cinetocoro de las cromátidas hermanas y la bi-orientación cromosomal.



**Figura 5. Estructura de la proteína MPS1.** Representación lineal de la proteína MPS1. La proteína MPS1 está compuesta por 857 aminoácidos. El amino terminal presenta cinco diferentes dominios los cuales modulan la localización de la proteína entre el cinetocoro y el centrosoma. El amino terminal también presenta un motivo denominado D-box, el cual regula la degradación de MPS1 vía ubiquitinación. En el carboxilo terminal se localiza el dominio de unión a OAZ1 (el cual regula la degradación de MPS1 en el centrosoma), el dominio cinasa, y el carboxilo terminal de MPS1.

### Localización de MPS1 en centrosomas

Actualmente, los mecanismos que permiten a la cinasa MPS1 localizarse en el centrosoma y promover su duplicación son parcialmente desconocidos. Se sabe que MPS1 se estabiliza al ser fosforilada en el aminoácido T468 por el complejo CDK2/A1 y A2 durante la transición de la fase del ciclo celular G1/S, incrementando su localización en el centrosoma. Este residuo se encuentra embebido en una señal de degradación situada en los aminoácidos 420-507 (165). La localización de MPS1 en el centrosoma también es controlada por el dominio TPR 3 y la hélice-C presente en el amino terminal de la cinasa (Figura 5). Se ha observado que estos dominios interaccionan con el canal de aniones dependiente de voltaje 3 (VDAC3) generando la localización de la cinasa hacia el centrosoma, principalmente en el centriolo primario (149, 166). Estando presente en el centrosoma, MPS1 interacciona directamente con



la proteína chaperona mtHsp70 (mortalina). Esta interacción ocasiona que MPS1 fosforile a mtHsp70 en los residuos T62 y S65 ocasionando que, de manera recíproca, MPS1 incremente su actividad cinasa. Este incremento es necesario para la promoción de la duplicación del centrosoma por MPS1 (167).

### **Degradación de MPS1**

La mayoría de las proteínas dependientes del ciclo celular son degradadas mediante su marcaje con cadenas de ubiquitina y su posterior degradación mediada por el proteasoma 26S. Se ha reportado que, tanto la subunidad catalítica 20S como las sub unidades regulatorias PA700 y PA28 del proteasoma se encuentran localizadas en el centrosoma (168, 169). Además, diversas proteínas que conforman al centrosoma como la cinasa Nek2 (170, 171) o la cinasa PLK4 (172, 173) son degradadas en el mismo centrosoma por el proteasoma mediante señales de poli-ubiquitinación. Sin embargo, MPS1 es degradada por el proteosoma que se encuentra presente en el centrosoma de manera independiente de ubiquitinación por la proteína Antizima Ornitin Descarboxilasa (OAZ). La ornitina es un metabolito intermediario del ciclo de la urea el cual es generado en el citosol a partir del aminoácido arginina. La generación de poliaminas se lleva a cabo cuando la enzima ornitín descarboxilasa (ODC) forma homodímeros los cuales son activos y catalizan la generación de la poliamina putrescina a partir de ornitina (174). Cuando hay un exceso de poliaminas se observa un incremento en los niveles de OAZ. Este incremento genera la disociación de los homo-dímeros de ODC ya que OAZ posee mayor afinidad con ODC, uniéndose en el carboxilo terminal de ODC (aminoácidos 376-461 y 106-212) formando heterodímeros enzimáticamente inactivos. La unión de OAZ con ODC permite que la señal de degradación presente en carboxilo terminal de ODC (aminoácidos 424-461) quede expuesta, dirigiendo a ODC al proteasoma para su degradación, liberando a OAZ para continuar la unión y marcaje a degradación de otras moléculas de ODC (175-179). OAZ también tiene otros sustratos que dirige para su degradación como Smad1, SNIP1, Aurora A, y ciclina D1 (180-184). Además, OAZ se localiza

en el centrosoma y se ha observado que marca hacia degradación a MPS1 a través de la señal de degradación presente en los aminoácidos 420-507 (Figura 5) a través del proteasoma presente en el mismo centrosoma, controlando de esta forma la duplicación del centrosoma (165, 185, 186).

De manera interesante, se ha reportado que MPS1 también es marcada en el citoplasma para su degradación por el proteasoma de manera dependiente de ubiquitinación. MPS1 posee en su amino terminal un motivo denominado caja de destrucción (D-box, aminoácidos 256-259, Figura 5) la cual consta de una secuencia iniciada por un residuo de arginina seguida de dos aminoácidos aleatorios y termina con una leucina (RxxL). Esta D-box interacciona con la ligasa de ubiquitinas denominada como complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) y sus proteínas activantes Cdc20 y Cdh1, poli-ubiquitinando a MPS1 y dirigiéndola a degradación (187, 188). Actualmente, no se sabe qué factores son los que determinan la selección de la vía por la cual MPS1 es degradada.

### **Múltiples centrosomas y errores cromosómicos.**

La presencia de múltiples centrosomas aumenta el riesgo de generar inestabilidad cromosómica, ya que se pueden formar husos multipolares los cuales proyectan microtúbulos que pueden anclarse con más de un cinetocoro. Estas uniones activan el punto de monitoreo del huso mitótico retrasando la entrada hacia anafase. Durante este tiempo de retraso, los múltiples cromosomas se agrupan para formar un huso pseudo-bipolar. El agrupamiento de centrosomas causa que los múltiples husos mitóticos con microtúbulos anclados a distintos cinetocoros estén orientados en distintos polos, formando uniones merotelicas o sintelicas. Bajo esta configuración, la célula puede formar micro-núcleos, fallar en la citocinesis y generar poliploidia, o realizar una segregación monotelica y generar aneuploidia (76, 189-191).

Existen otros factores que facilitan la producción de múltiples centrosomas, como la fusión celular, la interrupción de la citocinesis, por formación *de novo* durante la interfase, y mediante

la sobre-replicación empleando como templado un centriolo previamente sintetizado (76, 191). La presencia de múltiples centrosomas se ha observado en diferentes tipos de tumores (192) y se correlacionan con un elevado grado histológico e inestabilidad cromosómica en lesiones pre-cancerosas *in situ* de mama, próstata, y cérvix (193).

### **HPVs y Centrosomas**

Se ha demostrado que, en células no transformadas, la expresión estable de la oncoproteínas E6 del HPV16 acumula múltiples centrosomas de manera paralela con la generación de múltiples núcleos irregulares, mientras que la oncoproteína E7 del HPV16 induce una síntesis excesiva de procentriolos a partir del centriolo existente (194), de manera rápida, tras una expresión aguda y antes de presentar inestabilidad cromosómica en células mononucleadas no transformadas (195-197). El incremento en la síntesis de centrosomas por E7 se debe a distintos eventos como la activación de factores de transcripción E2F (138), la inhibición de p21 (198), y activación de CDK2 (199). Además, se ha demostrado que el dominio de unión a pRb, p107, y p130 es necesario para producir múltiples centrosomas de manera independiente de la degradación de estas proteínas reguladoras de crecimiento (196, 200, 201).

Recientemente, se ha encontrado que la oncoproteína E7 del HPV16 genera múltiples centrosomas a través de la regulación de la cinasa parecida a Polo-4 (PLK4) estabilizando el RNA mensajero (mRNA) de la enzima, incrementando su transcripción, y reclutándola aberrantemente al centrosoma (138). Sin embargo, otros estudios han encontrado la producción o inhibición de múltiples centriolos manipulando proteínas que tienen varias señales efectoras como la sobre-expresión o inhibición de CDK2 y el tratamiento con el inhibidor de proteasoma Z-L3VS (194, 202, 203), lo que sugiere la participación de otras proteínas sobre la síntesis de múltiples centriolos. Por otro lado, se ha observado que al sobre expresar una mutante de MPS1 carente de la señal de degradación de MPS1 codificada en

los exones 12 y 13 (MPS1  $\Delta$ 12/13) o generando una proteína que contenga una sustitución del residuo T468 por A468 se incrementa la replicación de centrosomas en distintas líneas celulares. Además, si se expresa una mutante negativa de MPS1 carente de actividad cinasa (MPS1-KD) o su depleción con RNAs de interferencia (siRNAs), se inhibe el ciclo de duplicación del centrosoma (204, 205). De esta manera, la sobreexpresión o la inhibición de la degradación de MPS1 puede generar múltiples rondas de síntesis de centrosomas. Es importante señalar que se ha encontrado que la oncoproteína E7 del HPV16 aumenta la actividad del factor de transcripción E2F (138, 199) el cual se ha reportado que participa en la regulación de la transcripción de MPS1 (206) por lo cual es plausible pensar que E7 también podría estar aumentando la producción de centrosomas a través de MPS1.

## **Hipótesis**

La proteína MPS1 contribuye al incremento en el número de centrosomas por E7 del HPV16.

## **Objetivo General**

Evaluar el papel de la proteína MPS1 en el incremento del número de centrosomas mediado por E7 del HPV16.

## **Objetivos Particulares**

- Evaluar la expresión y los niveles de proteína de MPS1 en células U2OS-E7 y células control.
- Establecer el modelo de estudio de amplificación de centrosomas mediante transfecciones estables de E7 en la línea celular U2OS.

- Determinar el número de centrosomas presentes en la línea celular U2OS-E7 y células control.
- Bloquear la expresión de MPS1 mediante RNAi y evaluar el número de centrosomas en la línea celular U2OS-E7 y células control.
- Inhibir la actividad cinasa de MPS1 mediante el inhibidor MPS1-IN-3 y evaluar el número de centrosomas en la línea celular U2OS-E7 y células control.

## **Materiales y Métodos**

### **Cultivo celular y transfección**

La línea celular U2OS deriva de osteosarcoma humano (Cat No HTB-96, Rockville, MD) fue adquirida de la American Tissue Culture Collection (ATCC) y se cultivó en medio modificado McCoy's 5<sup>a</sup> (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado con 10% de suero fetal bobino (Gibco, Carlsbad, CA) bajo condiciones estándares de cultivo (37 °C y atmosfera con 5% CO<sub>2</sub>). El plásmido que expresa a HPV16-E7 fue donado por el Dr. Patricio Gariglio (CINVESTAV, Ciudad de México). Para la transfección transitoria (48 h) de la línea celular U2OS, se utilizaron cuatro diferentes concentraciones de plásmido HPV16-E7 (2, 4, 6, y 8 µg) y como control negativo, se utilizaron 8 µg de vector vacío (control) para transfección. Para realizar estas transfecciones se utilizó Lipofectamina LTX con PLUS reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA) manteniendo a las células con el medio de cultivo OptiMEM (Life Technologies, Grand Island, NY) siguiendo las recomendaciones de fabricante. Para la transfección estable en las células U2OS, se emplearon 8 µg de plásmido HPV16-E7 y 8 µg de vector vacío. Después de 72 horas post-transfección, las células transfectadas se mantuvieron en medio de cultivo con antibiótico G418 Sulfato (Promega Corp, Woods Road Madison, WI) a una concentración de 1.2 mg/mL por tres semanas. Subsecuentemente, las células se mantuvieron en medio de cultivo con 100 µg/mL de G418 Sulfato.

El silenciamiento de MPS1 se realizó en células con expresión estable del vector vacío o de HPV16-E7. Se transfectaron transitoriamente 4 construcciones de shRNAs contra MPS1 (OriGene; Rockville, MD) y como control la transfección de una construcción de shRNA con secuencia aleatoria (OriGene; Rockville, MD) manteniendo las células en medio OptiMEM (Gibco; Grand Island, NY) y Lipofectamine LTX (Life Technologies; Carlsbad, CA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### **Reaccion en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa reversa (qRT-PCR)**

El RNA total celular se extrajo utilizando TRIzol reagent (Life Technologies; Carlsbad, CA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La calidad del RNA se midió usando el espectrofotometro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific; Wilmington, DE). Se tomó 1 µg de RNA total de cada muestra para sintetizar cDNA utilizando el kit High capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems; Vilnius, Lithuania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El PCR en tiempo real se realizó con el equipo Step-One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems; Carlsbad, CA) utilizando 1 µg por reacción del producto de la transcripción reversa y el reactivo SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems; Carlsbad, CA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La secuencia del RNA de MPS1 (NCBI Secuencia de Referencia: NM\_003318.4), 18s (NCBI Reference Sequence: NR\_145820.1) y HPV16-E7 (NCBI Secuencia de Referencia: HM211092.1) se obtuvieron de GenBank (207). Los primers empleados para la amplificación de E7 y MPS1 fueron diseñados con ayuda del programa en línea Primer-BLAST (208). Los niveles de expresión de cada gen se normalizaron con la expresión del gen constitutivo 18s (NCBI Secuencia de

Referencia: M10098.1 Tabla 1). Los datos obtenidos fueron analizados usando la ecuación  $2^{-\Delta\Delta CT}$  descrita previamente por Livak (209).

**Tabla 1. Primers empleados para qRT-PCR.**

| Gen      | primer sentido                       | primer anti-sentido                   | Temperatura de alineamiento | Tamaño del amplicón |
|----------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| HPV16-E7 | 5'-ATG GAG ATA CAC CTA CAT TGC-3'    | 5'-AAT GGG CTC TGT CCG GTT CT-3'      | 60 °C                       | 150 pb              |
| MPS1     | 5'-CAG AGG TTC CAG AGA GTA ACC AG-3' | 5'- GCT CAA AAG TGG TAT GTTTCT GCT-3' | 60 °C                       | 150 pb              |
| 18s      | 5'-TCG GAA CTG AGG CCA TGA TT-3'     | 5'-CGA ACC TCC GAC TTT CGT TCT-3'     | 60 °C                       | 150 pb              |

### **Extracción de Proteínas y Western blot**

Se extrajeron proteínas totales usando buffer de lisis RIPA (50 mM Tris-HCL pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 1 mM etilendiaminotetraacético (EDTA), 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y coctel de inhibidores de proteasas (Cell Signaling Technology; Danvers, MA) por 30 minutos en hielo. La concentración de proteínas fueron medidas utilizando el kit DC protein assay kit II (BioRad; Hercules, CA). Cantidades iguales de proteína se separaron a través de 10% SDS-PAGE y transferidas en una membrana de PVDF (Millipore; Darmstadt, Alemania). La membrana se bloqueó por una hora con leche sin grasa al 5% y se incubó con el anticuerpo primario MPS1 (sc-56968 Santa Cruz Biotechnology 1:500) toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se realizó desnudamiento (stripping) a la misma membrana, se bloqueó con leche sin grasa al 5% y se incubó el anticuerpo anti  $\beta$ -actina (sc-8432, Santa Cruz Biotechnology, 1:500) toda la noche a 4 °C. El anticuerpo secundario (616520, Invitrogen) acoplado a peroxidasa de rábano se utilizó a una dilución 1:5000 y la inmunoreactividad se visualizó usando Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL). El análisis densitométrico de las bandas inmunodetectadas se realizó utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health; Bethesda, Maryland) (210).

## **Inmunofluorescencia**

Se cultivaron las células en portaobjetos colocados en placas de cultivo de seis pozos en confluencia del 70%. Se fijaron con metanol frío por 10 minutos y se permeabilizaron con acetona fría por 1 minuto. La unión inespecífica se bloqueó con PBS y albumina 1% por 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios anti-centrina 1 (ab11257, Abcam, 1:300) y anti  $\gamma$ -tubulina (GTU-88, Sigma Aldrich, 1:1000) se incubaron a 4 °C toda la noche en cámara húmeda. Los anticuerpos secundarios (ab175700, Abcam, 1:50 y ab150081, Abcam, 1:500) se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. El DNA se contrastó con DAPI (Vectashield Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories; Burlingame, CA). Las imágenes digitales fueron adquiridas usando el software Zen lite (Carl Zeiss; Göttingen, Germany) y AxioImager A2 upright microscope (Carl Zeiss; Göttingen, Germany) con cámara AxioCam ICc5 y un objetivo  $\alpha$ Plan-FLUAR 100X/1,45 oil.

## **Cuantificación de anomalías del centrosoma**

Cada experimento fue realizado al menos por triplicado. Se contabilizó únicamente a las células que tuvieron presencia de señal para centrina y  $\gamma$ -tubulina cuantificando células con morfología nuclear normal en cada condición experimental. Se consideró como número normal de centrosomas la presencia de 1, 2 o 4 señales positivas de centrina y como anomalía centrosomal a las células que tuvieron más de cuatro señales positivas de centrina.

## **Análisis *in silico***

La secuencia de las proteínas MPS1 y PLK4 y su alineación se obtuvieron de la base de datos UniProt (211). Estas secuencias se sometieron a análisis de predicción de estructura secundaria y accesibilidad de superficie de proteínas utilizando el servidor



NetSurfP ver. 1.1 (212), además de un análisis de predicción de sitios de fosforilación específicos de cinasas en el programa GPS 2.0 (213). Para realizar el análisis solamente se incluyeron los sitios susceptibles de ser fosforilados que presentaran un score con diferencia no mayor a 1.5 respecto al score obtenido de residuos previamente reportados.

### **Análisis estadístico**

Para medir las diferencias entre medias de expresión de mRNA y del número de centrosomas se utilizó el análisis estadístico Student t test seguido por Welch's correction y One-Way Analysis Of Variance (ANOVA) seguido por Turkey's test. Ambos análisis se realizaron en el programa Graph-Pad-Prism (Versión 6.1 for Windows, GraphPad Software; La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Se graficaron los promedios  $\pm$  la desviación estándar y se consideró una diferencia significativa a un valor  $p < 0.05$ .

## **Resultados**

### **La proteína E7 de HPV16 incrementa el transcrito y los niveles de proteína de MPS1**

Debido a que la oncoproteína E7 de HPV16 (E7) altera la expresión de distintas proteínas involucradas en el ciclo de duplicación del centrosoma como PLK4 (138, 199, 201, 202), se determinaron los niveles de transcrito y de proteína de MPS1 ya que se ha reportado que esta proteína está involucrada en el ciclo de duplicación del centrosoma (165, 167, 185, 214). Se transfectó de manera estable un plásmido que codifica para E7 en células U2OS (U2OS-E7) empleando como control la transfección del plásmido vacío en células U2OS (control). La expresión de E7 se verificó mediante la realización de PCR punto final y la detección del amplicón de aproximadamente 120 pb mediante electroforesis. Como control positivo,

analizamos simultáneamente la expresión de HPV16-E7 en la línea celular SiHa, la cual es una línea celular derivada de carcinoma de células escamosas de cérvix que contienen integrado el genoma de HPV16, y como control negativo la línea celular C-33A la cual es una línea celular derivada de carcinoma de cérvix negativo para HPV (215). En la Figura 6A se observa la presencia del producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en U2OS-E7 y en la línea celular SiHa, mientras que no se observa en la línea celular C33-A. Mediante qRT-PCR, comparamos la expresión relativa del gen de la subunidad del RNA ribosomal 18s, resultando una expresión de E7 del 8% respecto a la expresión de 18s en U2OS-E7, mientras que en células control el porcentaje es 0.00000016 %, indicando que solamente la línea celular U2OS-E7 expresa la oncoproteína. Estos niveles de expresión de E7 son semejantes a los expresados en la línea celular SiHa los cuales fueron en promedio 13% respecto a la expresión de 18s. Además, estos resultados se validaron analizando la expresión de E7 en la línea celular C-33A en la cual no se observó expresión de E7 (Figura 6B).

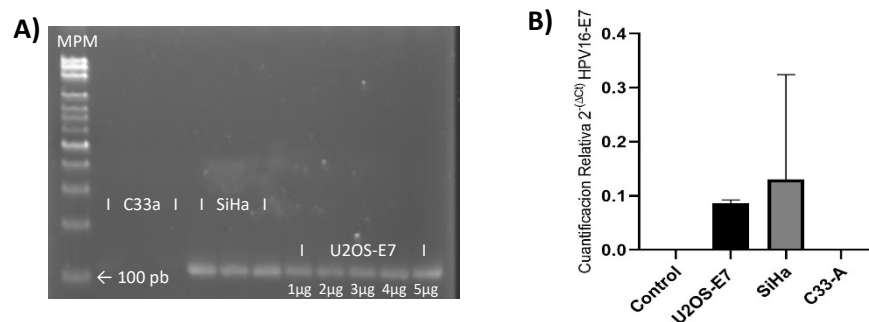
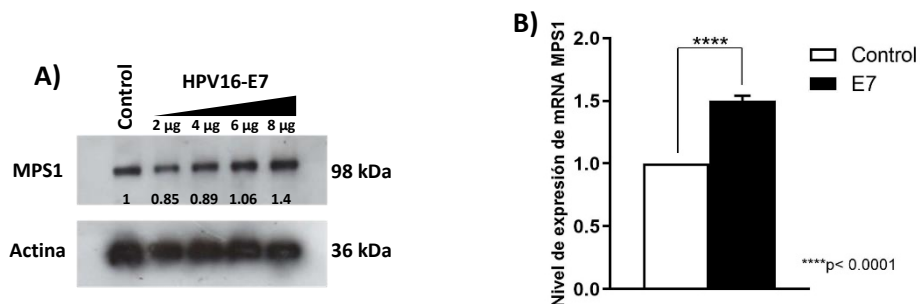


Figura 6. **Expresión de HPV16-E7 en células U2OS. A) Detección del amplicon por electroforesis.** Se observa el producto de PCR del mRNA de E7 transfectado en células U2OS (U2OS-E7) en aproximadamente 120 pb en un gel de agarosa al 1%. La expresión de HPV16-E7 en U2OS se encuentra a niveles similares a los observados en la línea celular SiHa que contiene el genoma de HPV16 y ausente en la línea celular C-33<sup>a</sup> la cual se reporta como negativa para el genoma de HPV. Se observan ligeras diferencias en la expresión empleando diferentes concentraciones del plásmido (1-5 µg). Marcador de peso molecular, MPM. **B) Detección de la expresión de HPV16-E7 en qRT-PCR en células U2OS.** Se muestra la cuantificación relativa de HPV16-E7. En células U2OS-E7 la expresión de E7 es del 8% respecto a la expresión medida del gen constitutivo 18s. La línea celular SiHa muestra una expresión similar del 13% respecto a la expresión del gen constitutivo 18s. Las células control y C-33A no presentaron expresión de E7.

Analizamos si la oncoproteína E7 incrementa los niveles de proteína de MPS1. Realizamos Western Blot para determinar los niveles proteicos de MPS1 en células transfectadas con concentraciones crecientes del plásmido que contiene a E7 (2-8 µg). Para poder comparar los resultados, analizamos los niveles de proteína de MPS1 en células transfectadas con el plásmido vacío empleando 8 µg. Encontramos que los niveles de proteína de MPS1 se incrementaron cuando se transfectaron 8 µg del plásmido que contiene a E7 en comparación con células transfectadas con la misma concentración del vector vacío (Figura 7A). Posteriormente, nos preguntamos si la presencia de E7 afecta la expresión de MPS1. Mediante qRT-PCR analizamos la transcripción de MPS1 en células U2OS transfectadas de manera estable con 8 µg de plásmido que contiene a HPV16-E7. Observamos un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.0001$ ) en la expresión del RNA mensajero (mRNA) de MPS1 en U2OS-E7 respecto a células control (Figura 7B). Estos resultados demuestran que HPV16-E7 induce un incremento *in vivo* en los niveles de mRNA y de proteína de MPS1.



**Figura 7. Determinación de la expresión y niveles de la proteína de MPS1 en células transfectadas con HPV16-E7.** Los niveles de proteína de MPS1 incrementan de manera gradual dependiendo de la cantidad de plásmido transfectado de HPV16-E7 en células U2OS en comparación a la transfección del vector vacío (Control). Los valores de densitometría se muestran debajo de cada banda. Se utilizó a Actina como control de carga. **B) Cuantificación relativa de la expresión de MPS1.** Mediante RT-qPCR se analizó en tres experimentos independientes la expresión del mRNA de MPS1 en células U2OS-E7 observándose un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.0001$ ) respecto a células transfectadas con el vector vacío (Control).

### HPV16-E7 promueve la amplificación del centrosoma

Anteriormente, el equipo de trabajo de Duensing reportó que HPV16-E7 promueve la síntesis anormal de múltiples centrosomas (195), por lo que decidimos replicar su modelo

experimental para probar nuestra hipótesis sobre la participación de MPS1 en la amplificación del centrosomas mediada por HPV16-E7. Empleando inmunofluorescencia indirecta detectamos dos distintas proteínas: centrina y gamma tubulina. Estas dos proteínas son conocidas por ser marcadores de centrosomas; la proteína centrina indica el número de centriolos presentes en cada centrosoma dado que se encuentra embebida en la parte distal de los centriolos (216), y la proteína gamma tubulina la cual se encuentra formando los anillos de gamma tubulina presentes en la parte distal del centriolo principal en donde se nuclean los microtúbulos que conforman el huso mitótico indicando la presencia de centrosomas funcionales (217).

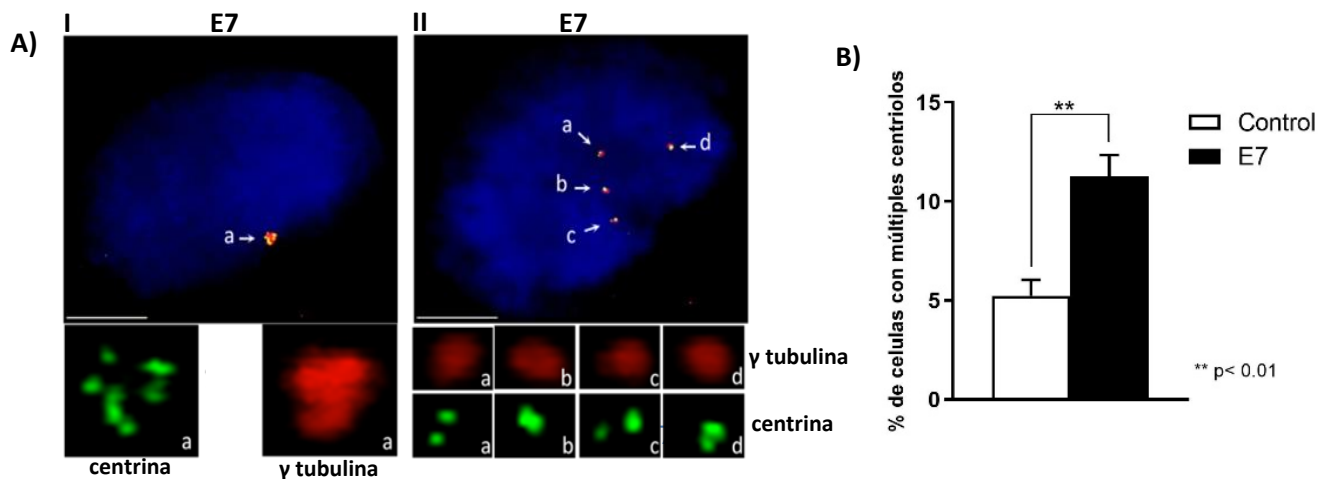
Se analizaron 500 células por cada replicado experimental contabilizando células con morfología nuclear normal que presentaran señal positiva para centrina y gamma tubulina. Encontramos que las células U2OS-E7 presentaron varios procentriolos en un solo centrosoma (Figura 8AI) o múltiples centrosomas con dos centriolos (Figura 8AII). El número de células control que presentaron anomalías en el centrosoma fue de 5.4%, mientras que en células U2OS-E7 el 11.28% mostraron aberraciones centrosomales. Esto significa un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.01$ , Figura 8B) de 2.15 veces más células con defectos en el centrosoma comparadas con células control. Estos resultados indican que la expresión de E7 incrementa el número de centrosomas en la línea celular U2OS, lo cual es consistente con los resultados previamente reportados por Duensing (195).

### **El silenciamiento de MPS1 disminuye la amplificación del centrosoma mediada por HPV16-E7**

Después de establecer el modelo de estudio, examinamos si MPS1 tiene algún papel en la amplificación de centrosomas mediada por HPV16-E7. Para esto, transfectamos cuatro diferentes construcciones de horquillas de RNA (shRNA) contra MPS1 para disminuir su expresión y como control negativo transfectamos una construcción aleatoria de shRNA (Scramble) en la línea celular U2OS-E7 transfectada establemente. 24 horas después de la

transfección, determinamos los niveles de proteína de MPS1 mediante Wester Blot. Encontramos que, de manera similar a lo observado en la figura 7A, los niveles de proteína de MPS1 incrementaron en U2OS-E7 de manera significativa (1.78 veces) comparado con células control. Como esperábamos, no se observaron señales de MPS1 después de la transfección de los shRNA contra MPS1 mientras que la construcción Scramble no tuvo ningún efecto sobre los niveles de MPS1 (Figura 9A).

Posteriormente, analizamos el efecto del silenciamiento de MPS1 sobre el número de centrosomas presentes en células U2OS-E7 y células control mediante inmunofluorescencia. Por cada replicado experimental se contabilizaron de manera aleatoria 100 células mononucleares con morfología nuclear normal que presentaron señal positiva para centrina y gamma-tubulina. Encontramos un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de células U2OS-E7 que presentaron más de 2 centrosomas respecto a células control (1.66 veces,  $p < 0.01$ , Figura 9C). Estos resultados son consistentes con los resultados mostrados en la Figura 8B. Por otro lado, cuando inhibimos la expresión de MPS1, el número de centrosomas presente en U2OS-E7 disminuye estadísticamente significativa a niveles similares a las células control (1.13 veces,  $p < 0.01$ , Figura 9C). Estos resultados sugieren que la presencia de MPS1 es necesaria para generar un incremento en el número de centrosomas mediada por HPV16-E7.



**Figura 8. Inmunofluorescencia para detectar el número de centrosomas en células transfectadas con HPV16-E7. A) Inmunodetección de centrosomas en células transfectadas con HPV16-E7.** Se realizó inmunofluorescencia para detectar  $\gamma$ -tubulina (rojo) y centrina (verde) contrastando el núcleo con DAPI (azul). Encontramos células con una nube de  $\gamma$ -tubulina rodeando a múltiples señales de centrina (I) o múltiples centrosomas con señales de  $\gamma$ -tubulina y dos señales de centrina (II). La barra de escala indica 100  $\mu$ m y el objetivo empleado fue 100X. **B) Análisis de células con múltiples centrosomas.** Se contabilizaron en tres experimentos individuales 500 células mononucleadas con señal de  $\gamma$ -tubulina y 2 señales de centrina o células con señal de  $\gamma$ -tubulina y más de 4 señales de centrina. Se observó un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.01$ ) en células transfectadas con HPV16-E7 respecto a células control.

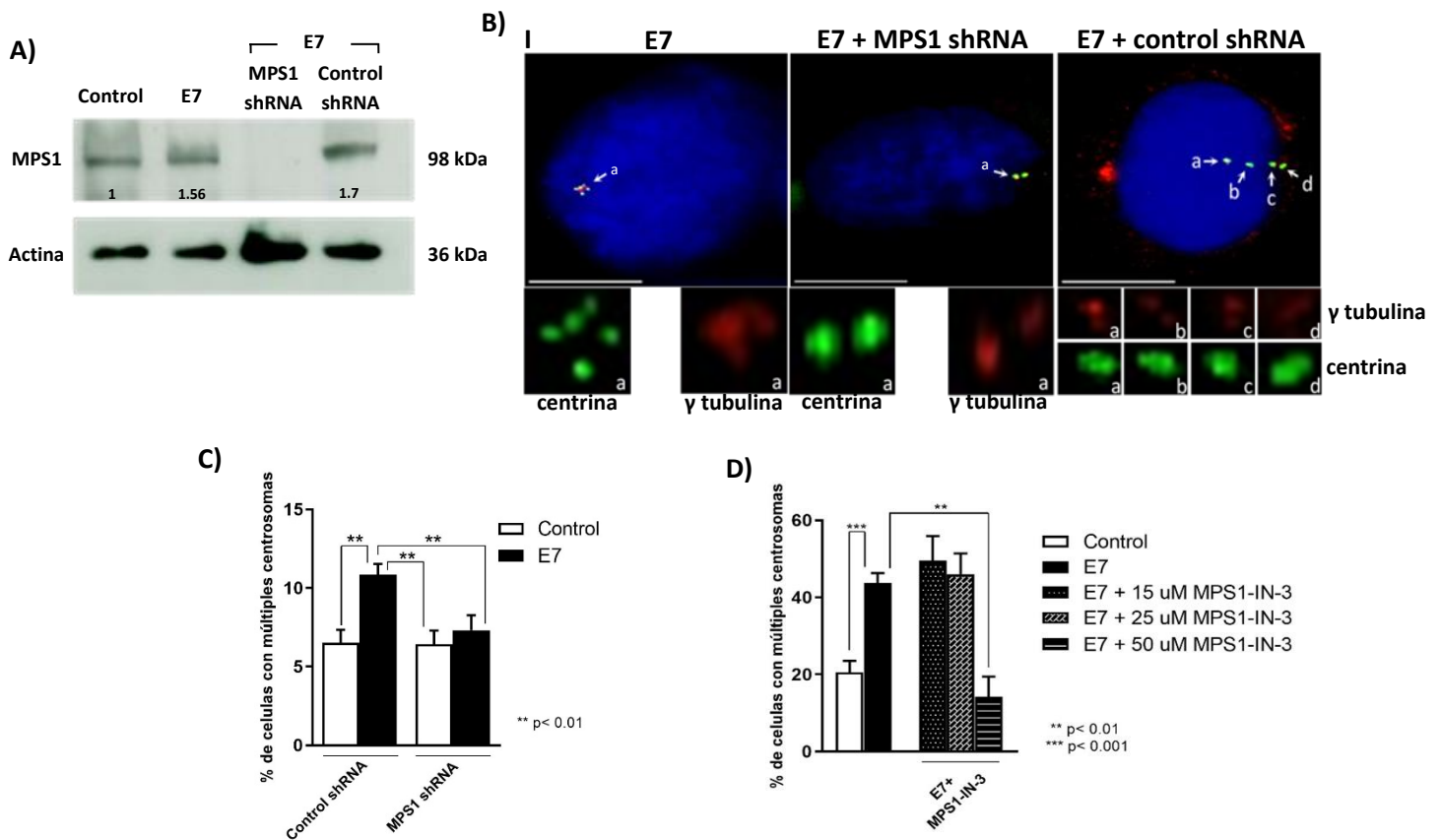
Para verificar que la presencia de MPS1 es necesaria para el incremento de centrosomas que genera HPV16-E7, decidimos usar un potente inhibidor selectivo de MPS1 denominado MPS1-IN-3 (218). Analizamos el efecto del silenciamiento de MPS1 en el número de centrosomas presentes en U2OS-E7 y células control por inmunofluorescencia. De nueva cuenta, encontramos un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de células U2OS-E7 que poseían múltiples centrosomas respecto a células control (2.13 veces,  $p < 0.001$ , Figura 9D). Empleamos tres cantidades crecientes de MPS1-IN-3 (15, 25 y 50  $\mu$ m de MPS1-IN-3 por 24 h) en células U2OS-E7 y observamos una disminución estadísticamente significativa en el número de células que poseían amplificación de centrosomas (3.07 veces,  $p < 0.01$ ) cuando las células U2OS-E7 fueron tratadas con la concentración más alta de MPS1-IN-3 (50  $\mu$ M). Este porcentaje de células es similar al porcentaje de células observado en células control (Figura 9D). Esta observación refuerza el posible papel de la presencia de MPS1 en la amplificación del centrosoma mediante HPV16-E7.

### **MPS1 y PLK4 podrían regularse mutuamente mediante fosforilación**

Duensing y colaboradores identificaron a la cinasa PLK4 como la proteína efectora en el incremento del número de centrosomas por HPV16-E7 (138). Basándonos en nuestros resultados, la pregunta consecuente fue: ¿Cuál es el mecanismo por el cual MPS1 participa en la generación de múltiples centrosomas por HPV16-E7? Es posible pensar que MPS1 y

PLK4 podrían estar interactuando de manera directa o indirecta para generar múltiples centrosomas bajo el efecto de HPV16-E7. Para explorar esta hipótesis, realizamos un ensayo *in silico* utilizando el programa de predicción de sitios específicos de fosforilación GPS3.0 (213) para identificar residuos en las cinasas MPS1 y PLK4 que sean susceptibles de ser fosforilados por ambas enzimas. De manera complementaria, empleamos el programa en línea NetSurfP (212) el cual predice la estructura secundaria de proteínas y la superficie accesible de los residuos de MPS1 y PLK4 identificados de ser susceptibles a fosforilación. Para validar los datos obtenidos por ambos programas, analizamos dos residuos en PLK4 (91) y uno en MPS1 (157) los cuales ya se han reportado que son fosforilados *in vitro*. La tabla 1 muestra los residuos en PLK4 que son susceptibles de ser fosforilados por MPS1 (A) y los residuos presentes en MPS1 que son susceptibles de ser fosforilados por PLK4 (B), la accesibilidad de estos sitios para ser fosforilados, los valores predictivos de fosforilación y el dominio donde los residuos están localizados. Este análisis predice que dos residuos presentes en PLK4 pueden ser fosforilados por MPS1, los cuales se encuentran conservados en la mayoría de las especies de vertebrados que fueron comparadas (Figura 10A). El valor arrojado para estos dos residuos fue similar a los obtenidos para los residuos S282 y T295, los cuales se ha demostrado experimentalmente que son auto fosforilados (91). Nuestro análisis predice que PLK4 podría fosforilar tres residuos presentes en MPS1, los cuales también se encuentran conservados en la mayoría de las especies de vertebrados que se analizaron (Figura 10B-D). De manera notable, el residuo S709 se encuentra presente en el dominio cinasa de MPS1 (Tabla 2). De igual forma, el valor obtenido de estos tres residuos fue similar al obtenido para el residuo T676 el cual también se ha reportado como auto fosforilable (157). Estos datos sugieren que tanto MPS1 como PLK4 podrían interactuar de manera directa o indirecta para regular su actividad en la generación de múltiples centrosomas mediados por HPV16-E7, por lo que decidimos explorar esta posibilidad realizando una inmunoprecipitación para detectar la interacción de estas dos enzimas. Realizamos la extracción proteica de

células U2OS e incubamos 80  $\mu\text{g}$  de proteína con el conjugado de perlas magnéticas y los anticuerpos anti MPS1 y anti PLK4 por separado. Posteriormente, se realizó Western Blot para detectar a la proteína MPS1. Lamentablemente, aun cuando detectamos señal de MPS1 en ambos extractos inmunoprecipitados con anti-MPS1 y anti-PLK4, no pudimos encontrar señal positiva de PLK4 en ninguna inmunoprecipitación realizada (Figura 11).



**Figura 9. Silenciamiento e inhibición de la proteína MPS1. A) Silenciamiento de MPS1 mediante shRNA.** Se realizó la transfección de cuatro distintas construcciones de shRNAs (MPS1 shRNA) en células transfectadas con E7 logrando silenciar la expresión de MPS1. La transfección de una secuencia aleatoria (shRNA control) no tiene efecto en la expresión de MPS1 manteniendo el incremento en los niveles de proteína generados por E7 (control Vs E7 y control Vs E7 control shRNA). Los valores de densitometría se muestran debajo de cada banda. **B) Inmunodetección de centrosomas en células transfectadas con E7.** Se realizó inmunofluorescencia para detectar  $\gamma$ -tubulina (rojo) y centrina (verde), contrastando el núcleo con DAPI (azul). Imágenes representativas de células mononucleadas con señales de  $\gamma$ -tubulina y múltiples señales de centrina generados por la transfección de E7 (I), células mononucleadas con señales de  $\gamma$ -tubulina y dos señales de centrina transfectadas con las 4 construcciones de shRNA MPS1 (II) y células mononucleadas con señales de  $\gamma$ -tubulina y múltiples señales de centrina transfectadas con la construcción aleatoria de shRNA (III). La barra de escala indica 100  $\mu\text{m}$  y el objetivo empleado fue 100X. **C) Análisis de células con múltiples centrosomas.** Se contabilizaron en tres experimentos



individuales 500 células mononucleadas con señal de  $\gamma$ -tubulina y 2 señales de centrina o células con señal de  $\gamma$ -tubulina y más de 4 señales de centrina. Se observa un porcentaje mayor estadísticamente significativo ( $p < 0.01$ ) en células transfectadas con E7 comparado con células control. Esta amplificación de centrosomas es disminuida significativamente al inhibir a MPS1 con shRNAs ( $p < 0.01$ ). **D) Cuantificación del porcentaje de células con múltiples centrosomas tratadas con el inhibidor MPS1-IN-3.** Células mononucleadas con señal positiva para centrina y gama tubulina fueron contabilizadas en tres experimentos individuales. Se observó un porcentaje estadísticamente significativo más alto (2.3 veces,  $p < 0.001$ ) en células U2OS-E7 comparadas con células control. Esta amplificación de centrosomas disminuye significativamente al inhibir a la cinasa con 50  $\mu\text{g}$  del inhibidor MPS1-IN-3 (3.07 veces,  $p < 0.01$ ).

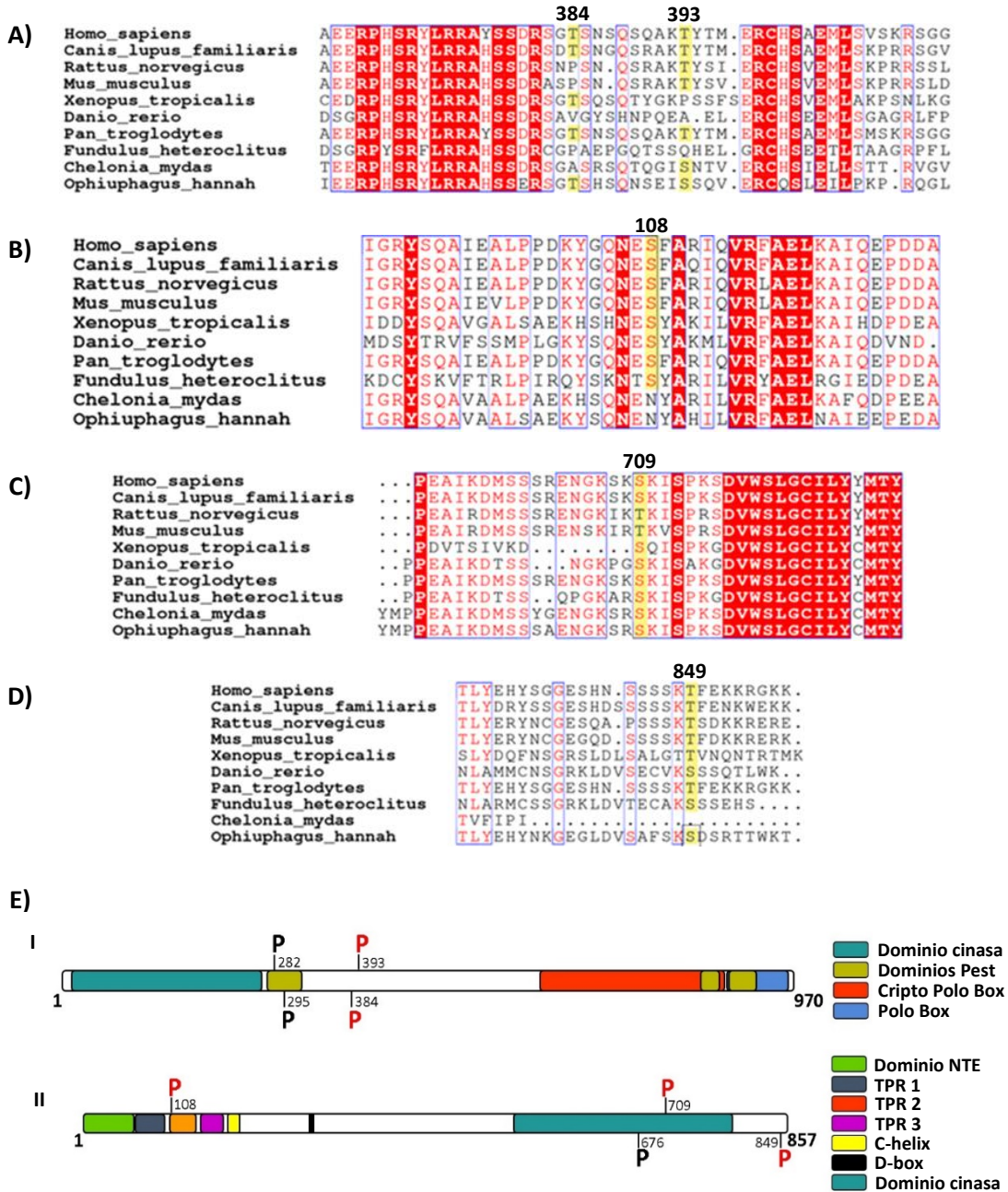
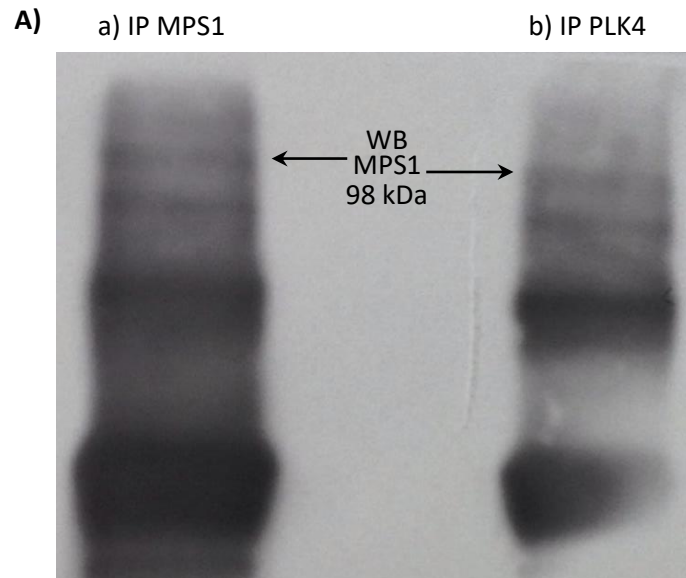


Figura 10. Alineamiento de la secuencia de la proteína PLK4 y MPS1 en humanos entre diferentes especies de vertebrados. A) Representación lineal de la proteína PLK4 en humanos.

En verde se muestran los aminoácidos conservados entre especies, en rojo se muestran los aminoácidos de carácter básico adyacentes al aminoácido susceptible de ser fosforilado por MPS1 y en amarillo los residuos susceptibles de ser fosforilados por MPS1. **B y C) Representación lineal de la proteína MPS1 en humanos.** En verde se muestran los aminoácidos conservados entre especies, en rojo se muestran los aminoácidos de carácter básico adyacentes al aminoácido susceptible de ser fosforilado por PLK4 y en amarillo los residuos susceptibles de ser fosforilados por MPS1. **D) Representación de las cinasas PLK4 y MPS1. I)** Representación lineal de la cinasa PLK4. Se observan 4 distintos dominios reportados en la literatura y los posibles sitios de fosforilación mediados por MPS1 (P rojo) así como los sitios de autofosforilación reportados (91) (P negro). **II)** Representación lineal de la cinasa MPS1. Se observan 7 dominios reportados en la literatura y los posibles sitios de fosforilación mediados por PLK4 (P rojo) así como el sitio de autofosforilación reportado en la literatura (157) (P negro).

**Tabla 2. Analisis *in silico* de los posibles sitios de fosforilación de MPS1 y PLK4.** Posibles residuos de fosforilación en PLK4 por la cinasa MPS1 y en la proteína MPS1 por la cinasa PLK4. **A)** Se muestran en rojo dos posibles residuos expuestos en la cinasa PLK4 que pueden ser fosforilados por MPS1. Estos residuos presentan un score parecido al obtenido a los residuos S282 y T295 autofosforilados (91) presentes en el dominio PEST1 (negro). **B)** Se muestran en rojo tres posibles residuos expuestos en la cinasa MPS1 que pueden ser fosforilados por PLK4. Estos residuos presentan un score parecido al obtenido al residuo T676 autofosforilado (157) presente en el dominio cinasa (KD) (negro).

| A) MPS1                 | Aminoácido en PLK4 | Disposición del Aminoácido | Score | Dominio |
|-------------------------|--------------------|----------------------------|-------|---------|
|                         | T384               | Expuesto                   | 4.12  |         |
|                         | T393               | Expuesto                   | 4.25  |         |
| Autofosforilación (91)  | S282               | Expuesto                   | 6.27  | pest 1  |
| Autofosforilación (91)  | T295               | Expuesto                   | 5.43  | pest 1  |
| B) PLK4                 | Aminoácido en MPS1 | Disposición del Aminoácido | Score | Dominio |
|                         | S108               | Expuesto                   | 6.66  |         |
|                         | S709               | Expuesto                   | 6.66  | cinasa  |
|                         | T849               | Expuesto                   | 5     |         |
| Autofosforilación (157) | T676               | Expuesto                   | 5.62  | cinasa  |



**Figura 11. Coinmunoprecipitación de MPS1 y PLK4 usando la etiqueta FLAG.** Se inmunoprecipitó a la proteína MPS1 (a) y a la proteína PLK4 (b) en extractos proteicos de células U2OS. Posteriormente se realizó Western Blot en ambos extractos proteicos para inmunodetectar la proteína MPS1. Se observa una banda en el peso esperado para la proteína MPS1.

## Discusión

La amplificación de centrosomas es el principal mecanismo por el cual se generan uniones merotelicas y se presentan retrasos en la segregación cromosomal durante la división celular (219, 220). Estos defectos centrosomales pueden ser detectados en una amplia variedad de tumores sólidos (221-223) y en varios tipos de malignidades hematológicas (224) por lo que se han asociado con tumores de alto grado y con mal pronóstico. Varias líneas de investigación han demostrado la habilidad de la oncoproteína E7 del HPV16 en la amplificación de centrosomas a través de la alteración del ciclo de duplicación centriolar por la desregulación de varias proteínas como CDK2/ciclina E/A, E2F1, y PLK4 (138, 200, 201). Por otro lado, también ha sido reportado que, si se inhibe la degradación de la proteína MPS1,

se induce la amplificación de centrosomas (165, 185). En este trabajo investigamos la posible participación de la proteína MPS1 en la amplificación de centrosomas mediada por HPV16-E7. El transcrito y los niveles de proteína de MPS1 se mantienen disminuidos cuando la célula entra en la fase del ciclo celular G1/S, e incrementan en la fase S alcanzando su máximo nivel en G2 tardía/M, y disminuyendo nuevamente cuando la célula entra de nuevo en G1 (187, 225). Varios estudios han demostrado que múltiples genes regulados durante el ciclo celular son reprimidos por el complejo DREAM (226-228) y son activados por el complejo MMB/FOXM1 (228-230) a través de su unión con el dominio denominado región homóloga de genes del ciclo celular (CHR) presente en los promotores de estos genes. Ambos complejos DREAM y MMB/FOXM1 están compuestos por otro subcomplejo proteico denominado como MuvB, el cual contiene las proteínas LIN9, LIN37, LIN52, LIN53, y LIN54. Durante la fase G0 y G1/S, el complejo MuvB se une con el complejo central formado por las proteínas p53/E2F4-5/DP1-2 formando el complejo DREAM, el cual se encuentra presente en el promotor de genes tempranos y tardíos del ciclo celular reprimiendo su expresión (226-228). Durante la fase S, el complejo DREAM se disocia, liberando el complejo central MuvB, permitiendo que la proteína B-Myb se una a MuvB formando el complejo MMB. Este nuevo complejo recluta al factor de transcripción FOXM1, promoviendo la transcripción de los genes tardíos del ciclo celular (228-230). De manera interesante, MPS1 posee un dominio CHR a 48 pares de base río debajo de su sitio de transcripción (231), donde el complejo DREAM puede unirse. Sin embargo aún no se ha comprobado si la expresión de MPS1 es regulada por los complejos DREAM y MMB/FOXM1, y si otras proteínas pudieran estar involucradas, como el factor de transcripción E2F1 (232). En este trabajo, reportamos que los niveles de transcrito y de proteína de MPS1 se incrementaron cuando transfectamos la oncoproteína HPV16-E7 en células U2OS (Figura 7A y B). Especulamos que este incremento puede ser explicado si HPV16-E7 promueve la disociación del complejo DREAM a través de la degradación de la proteína p130 y su interacción con los complejos E2F1 y DP1-2 (233, 234). HPV16-E7 también

podría regular la expresión de MPS1 a través del factor de transcripción B-Myb ya que se ha reportado que E7 incrementa la transcripción de B-Myb, generando un incremento en la formación del complejo MMB/FOXM1. Además, se ha demostrado que HPV16-E7 también puede unirse al complejo MMB/FOXM1 generando un incremento en la transcripción de múltiples genes del ciclo celular (234-236). Estos reportes son consistentes con nuestras observaciones sobre el incremento del transcrito y de los niveles de proteína de MPS1 mediados por HPV16-E7.

De manera interesante, encontramos que el aumento de mRNA y de proteína de MPS1 mediado por HPV16-E7 se asoció con la generación de múltiples centrosomas. Después de generar una línea celular que expresa establemente HPV16-E7, observamos la amplificación de centrosomas (Figura 8B) de manera consistente a lo reportado previamente (195). Subsecuentemente, empleando el mismo modelo, disminuimos la expresión de MPS1 mediante shRNAs y bloqueando la actividad de MPS1 con el inhibidor selectivo MPS1-IN-3. Esta depleción generó una disminución significativa en el número de células con múltiples centrosomas (Figura 8C y D). Anteriormente, Tannous y colaboradores demostraron que empleando 2, 5 o 10 µg de MPS1-IN-3 se inhibe la formación del punto de monitoreo del huso mitótico en células U2OS arrestadas en mitosis donde MPS1 juega un papel crítico. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en la amplificación del centrosoma empleando las concentraciones del fármaco reportadas en nuestro modelo (218). Sin embargo, a una concentración mayor de MPS1-IN-3 si logramos observar una reducción en el número de células con múltiples centrosomas. Este fenómeno pudiera explicarse debido al hecho que las células U2OS-E7 empleadas en este trabajo expresan de manera estable a HPV16-E7, lo cual genera un incremento en mRNA y proteína de MPS1. Por lo tanto, las concentraciones reportadas del inhibidor MPS1-IN-3 no fueron suficientes para disminuir la

actividad global de MPS1 y poder observar en nuestro modelo una disminución en el número de células que presentaban múltiples centrosomas.

Estos resultados correlacionan con lo reportado por Duensing donde la reducción de la generación de múltiples centrosomas que HPV16-E7 promueve utilizando siRNAs para inhibir la expresión de la cinasa PLK4 (138), lo cual sugiere que MPS1 podría estar involucrada en este fenómeno. Por esta razón, decidimos realizar un análisis *in silico* para predecir residuos susceptibles de ser fosforilados por estas dos proteínas. Encontramos residuos fosforilables en ambas cinasas (PLK4 y MPS1), los cuales están conservados en la mayoría de los vertebrados que se analizaron (Figura 10). Se ha reportado que PLK4 promueve su degradación mediante su autofosforilación en los residuos S282 y T295 (91), los cuales están presentes en el dominio PEST1 (237) (Figura 10E1). Nuestro análisis *in silico* mostro que los residuos T384 y T393 presentes en PLK4 son susceptibles de ser fosforilados por MPS1 (Figura 10A). Estos residuos están localizados en una región no conservada entre los dominios cinasa, PEST1, y criptic polo Box (Figura 10E1). Actualmente no se conoce si este fragmento ejerce algún control en la función de la proteína en humanos. Sin embargo, Klebba y colaboradores reportaron que en células de *Drosophila melanogaster*, la región denominada Linker 1 (L1, la cual está localizada entre los dominios cinasa, el elemento regulatorio rio abajo (DRE) y la criptic box) ejerce un control auto inhibitorio sobre la activación de PLK4 y que esta inhibición puede liberarse a través de la interacción del dominio criptic box localizado en el carboxilo terminal de PLK4 con otra proteína aun no identificada (238). Bajo este escenario, hipotetizamos que MPS1 podría inducir la amplificación de centrosomas mediante la fosforilación de los residuos T282 y/o T295 y la subsecuente activación de la cinasa PLK4. En resumen, el aumento de los niveles de proteína de MPS1 y PLK4 por HPV16-E7 podría generar un incremento en la cantidad de proteína de PLK4 y activación por acción de MPS1, resultando en una alteración en el ciclo normal de duplicación del centrosoma.



Por otro lado, el análisis *in silico* predijo que la cinasa PLK4 podría fosforilar a MPS1 en tres residuos: S108, S709, y T849 (Figura 10B-D). El residuo S108 se encuentra dentro del motivo TPR2 (Figura 10EII), el cual es necesario para determinar la localización de MPS1 hacia el cinetocoro junto con el motivo TPR1 y NTE (146, 149). Lo que nos lleva a pensar que la posible fosforilación de MPS1 en el residuo S108 por PLK4 pudiera generar un cambio conformacional en MPS1 el cual podría prevenir la dimerización de MPS1 y, por lo tanto, prevenir también su localización en el cinetocoro. Esta fosforilación podría también estar exponiendo el motivo TPR3 y la hélice C (239) lo cual podría estar favoreciendo el reclutamiento de MPS1 hacia el centrosoma (149). En este sentido, Dhayalan y colaboradores identificaron 91 diferentes blancos de la metiltransferasa SET7/9, incluyendo el residuo K708 de MPS1 (240). Nuestro análisis *in silico* detectó que PLK4 puede fosforilar el residuo S709 de MPS1. Estos datos nos permiten especular que la actividad cinasa de MPS1 puede ser regulada mediante el alternamiento entre metilación-fosforilación, el cual podría ser realizado por la fosforilación de PLK4 en el residuo S709 de MPS1 previniendo la metilación de SET7/9 en el residuo K708 de MPS1 y viceversa (241). Finalmente, el residuo T849 de MPS1 susceptible de ser fosforilado por PLK4 reside fuera del dominio cinasa (Figura 10DII). Sin embargo, se ha encontrado que la mutación de otros residuos fuera del dominio cinasa es capaz de modular la actividad de MPS1 *in vitro* (242). Así, la fosforilación de este residuo por PLK4 podría incrementar la actividad cinasa de MPS1 y, por lo tanto, incrementar el número de centrosomas.

De manera notable, varios residuos han sido identificados que son auto fosforilados por MPS1, uno de ellos es el residuo T849 (242). Sin embargo, también se ha demostrado que estos sitios son sustratos de otras cinasas como PLK1 (243); por lo tanto, es posible que PLK4 pueda fosforilar algunos residuos que son auto fosforilados por MPS1. La significancia de estos hallazgos en la actividad de MPS1 aún no se conoce, lamentablemente durante la

realización de este trabajo no pudimos mostrar evidencia científica que pudiera sugerir una posible interacción de estas dos cinasas. Sería interesante determinar el estado de fosforilación de las cinasas MPS1 y PLK4 en estos residuos y su posible relación en la generación de múltiples centrosomas mediados por HPV16-E7.

## Conclusiones

En conjunto, los datos mostrados en este trabajo indican que:

- La proteína HPV16-E7 incrementa los niveles de proteína de MPS1 en la línea celular U2OS.
- La proteína HPV16-E7 incrementa la expresión de MPS1 en la línea celular U2OS.
- La disminución de los niveles de proteína MPS1 inhiben la amplificación de centrosomas por efecto de HPV16-E7 en la línea celular U2OS.
- La inhibición de la actividad cinsasa de MPS1 inhibe la amplificación de centrosomas por efecto de HPV16-E7 en la línea celular U2OS.

## Bibliografía

1. Jenkins O, Earnshaw D, Sarginson G, Del Vecchio A, Tsai J, Kallender H, et al. Characterization of the helicase and ATPase activity of human papillomavirus type 6b E1 protein. *J Gen Virol.* 1996;77 ( Pt 8):1805-9.
2. McBride AA. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res.* 2008;72:155-205.
3. Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(2):215-22.
4. Conway MJ, Meyers C. Replication and assembly of human papillomaviruses. *J Dent Res.* 2009;88(4):307-17.
5. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(8):550-60.
6. Mukonoweshuro P, Oriowolo A, Smith M. Audit of the histological definition of cervical transformation zone. *J Clin Pathol.* 2005;58(6):671.
7. Pudney J, Quayle AJ, Anderson DJ. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biol Reprod.* 2005;73(6):1253-63.
8. Duensing S, Munger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer.* 2004;109(2):157-62.
9. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 3:S3/1-10.



10. Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G, Christensen ND. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J Virol.* 2006;80(18):8940-50.
11. Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol.* 2003;77(24):13125-35.
12. McMillan NA, Payne E, Frazer IH, Evander M. Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology.* 1999;261(2):271-9.
13. Wallace L, Roberts-Thompson L, Reichelt J. Deletion of K1/K10 does not impair epidermal stratification but affects desmosomal structure and nuclear integrity. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 7):1750-8.
14. Bousarghin L, Touze A, Sizaret PY, Coursaget P. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol.* 2003;77(6):3846-50.
15. Richards RM, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(5):1522-7.
16. Kamper N, Day PM, Nowak T, Selinka HC, Florin L, Bolscher J, et al. A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol.* 2006;80(2):759-68.
17. Florin L, Becker KA, Sapp C, Lambert C, Sirma H, Muller M, et al. Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70. *J Virol.* 2004;78(11):5546-53.
18. Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(39):14252-7.
19. Maul GG, Negorev D, Bell P, Ishov AM. Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct Biol.* 2000;129(2-3):278-87.
20. Ganguly N, Parihar SP. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci.* 2009;34(1):113-23.
21. Ganguly N. Human papillomavirus-16 E5 protein: oncogenic role and therapeutic value. *Cell Oncol (Dordr).* 2012;35(2):67-76.
22. Desaintes C, Demeret C. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin Cancer Biol.* 1996;7(6):339-47.
23. Bernard HU. Regulatory elements in the viral genome. *Virology.* 2013;445(1-2):197-204.
24. Pittayakhajonwut D. DNA replication and genome maintenance of human papillomavirus type 16 in mammalian cells 2010. Available from: <http://digitalcommons.unl.edu/dissertations/AAI3390332>.
25. Van Horn G, Sheikh S, Khan SA. Regulation of human papillomavirus type 1 replication by the viral E2 protein. *Virology.* 2001;287(1):214-24.
26. Knight GL, Turnell AS, Roberts S. Role for Wee1 in inhibition of G2-to-M transition through the cooperation of distinct human papillomavirus type 1 E4 proteins. *J Virol.* 2006;80(15):7416-26.
27. Ashrafi GH, Brown DR, Fife KH, Campo MS. Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins. *Virus Res.* 2006;120(1-2):208-11.
28. O'Brien PM, Saveria Campo M. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Res.* 2002;88(1-2):103-17.
29. DiMaio D, Petti LM. The E5 proteins. *Virology.* 2013;445(1-2):99-114.
30. Munger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene.* 2001;20(54):7888-98.

31. Nakagawa S, Huibregtse JM. Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(21):8244-53.
32. Glaunsinger BA, Lee SS, Thomas M, Banks L, Javier R. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene*. 2000;19(46):5270-80.
33. Thomas M, Dasgupta J, Zhang Y, Chen X, Banks L. Analysis of specificity determinants in the interactions of different HPV E6 proteins with their PDZ domain-containing substrates. *Virology*. 2008;376(2):371-8.
34. Thomas M, Laura R, Hepner K, Guccione E, Sawyers C, Lasky L, et al. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene*. 2002;21(33):5088-96.
35. Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev*. 1998;12(13):2061-72.
36. Lu Z, Hu X, Li Y, Zheng L, Zhou Y, Jiang H, et al. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein interferences with insulin signaling pathway by binding to tuberlin. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(34):35664-70.
37. Elston RC, Naphthine S, Doorbar J. The identification of a conserved binding motif within human papillomavirus type 16 E6 binding peptides, E6AP and E6BP. *J Gen Virol*. 1998;79 (Pt 2):371-4.
38. Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev*. 2000;14(23):3065-73.
39. Chen JJ, Reid CE, Band V, Androphy EJ. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science*. 1995;269(5223):529-31.
40. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *The EMBO journal*. 1991;10(13):4129-35.
41. Martinez-Zapien D, Ruiz FX, Poirson J, Mitschler A, Ramirez J, Forster A, et al. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature*. 2016;529(7587):541-5.
42. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(2):775-84.
43. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993;75(3):495-505.
44. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990;63(6):1129-36.
45. McIntyre MC, Frattini MG, Grossman SR, Laimins LA. Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J Virol*. 1993;67(6):3142-50.
46. Clemens KE, Brent R, Gyuris J, Munger K. Dimerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein in vivo. *Virology*. 1995;214(1):289-93.
47. Barbosa MS, Edmonds C, Fisher C, Schiller JT, Lowy DR, Vousden KH. The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *The EMBO journal*. 1990;9(1):153-60.

48. Todorovic B, Hung K, Massimi P, Avvakumov N, Dick FA, Shaw GS, et al. Conserved region 3 of human papillomavirus 16 E7 contributes to deregulation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol.* 2012;86(24):13313-23.
49. Patrick DR, Oliff A, Heimbrook DC. Identification of a novel retinoblastoma gene product binding site on human papillomavirus type 16 E7 protein. *The Journal of biological chemistry.* 1994;269(9):6842-50.
50. Liu X, Clements A, Zhao K, Marmorstein R. Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *The Journal of biological chemistry.* 2006;281(1):578-86.
51. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 1997;11(16):2090-100.
52. Jones DL, Alani RM, Munger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* 1997;11(16):2101-11.
53. Massimi P, Pim D, Banks L. Human papillomavirus type 16 E7 binds to the conserved carboxy-terminal region of the TATA box binding protein and this contributes to E7 transforming activity. *J Gen Virol.* 1997;78 ( Pt 10):2607-13.
54. Hwang SG, Lee D, Kim J, Seo T, Choe J. Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *The Journal of biological chemistry.* 2002;277(4):2923-30.
55. Antinore MJ, Birrer MJ, Patel D, Nader L, McCance DJ. The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *The EMBO journal.* 1996;15(8):1950-60.
56. Avvakumov N, Torchia J, Mymryk JS. Interaction of the HPV E7 proteins with the pCAF acetyltransferase. *Oncogene.* 2003;22(25):3833-41.
57. Davies R, Hicks R, Crook T, Morris J, Vousden K. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *J Virol.* 1993;67(5):2521-8.
58. McIntyre MC, Ruesch MN, Laimins LA. Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology.* 1996;215(1):73-82.
59. He W, Staples D, Smith C, Fisher C. Direct activation of cyclin-dependent kinase 2 by human papillomavirus E7. *J Virol.* 2003;77(19):10566-74.
60. Berezutskaya E, Yu B, Morozov A, Raychaudhuri P, Bagchi S. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research.* 1997;8(12):1277-86.
61. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 1989;243(4893):934-7.
62. Roman A, Munger K. The papillomavirus E7 proteins. *Virology.* 2013;445(1-2):138-68.
63. Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murrant T, Broker TR, Chow LT. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev.* 1995;9(19):2335-49.
64. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Durr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene.* 1996;13(11):2323-30.
65. Mannhardt B, Weinzimer SA, Wagner M, Fiedler M, Cohen P, Jansen-Durr P, et al. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein binds and inactivates growth-inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3. *Molecular and cellular biology.* 2000;20(17):6483-95.

66. Longworth MS, Wilson R, Laimins LA. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *The EMBO journal*. 2005;24(10):1821-30.
67. Huh KW, DeMasi J, Ogawa H, Nakatani Y, Howley PM, Munger K. Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(32):11492-7.
68. Bernat A, Avvakumov N, Mymryk JS, Banks L. Interaction between the HPV E7 oncoprotein and the transcriptional coactivator p300. *Oncogene*. 2003;22(39):7871-81.
69. Schilling B, De-Medina T, Syken J, Vidal M, Munger K. A novel human DnaJ protein, hTid-1, a homolog of the *Drosophila* tumor suppressor protein Tid56, can interact with the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Virology*. 1998;247(1):74-85.
70. Lee D, Lim C, Seo T, Kwon H, Min H, Choe J. The viral oncogene human papillomavirus E7 deregulates transcriptional silencing by Brm-related gene 1 via molecular interactions. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(50):48842-8.
71. Phillips AC, Vousden KH. Analysis of the interaction between human papillomavirus type 16 E7 and the TATA-binding protein, TBP. *J Gen Virol*. 1997;78 ( Pt 4):905-9.
72. Massimi P, Pim D, Storey A, Banks L. HPV-16 E7 and adenovirus E1a complex formation with TATA box binding protein is enhanced by casein kinase II phosphorylation. *Oncogene*. 1996;12(11):2325-30.
73. Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, et al. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *The EMBO journal*. 1999;18(9):2449-58.
74. Zwerschke W, Mazurek S, Massimi P, Banks L, Eigenbrodt E, Jansen-Durr P. Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(4):1291-6.
75. Abbas T, Keaton MA, Dutta A. Genomic instability in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(3):a012914.
76. Vitre BD, Cleveland DW. Centrosomes, chromosome instability (CIN) and aneuploidy. *Current Opinion in Cell Biology*. 2012;24(6):809-15.
77. Strnad P, Gonczy P. Mechanisms of procentriole formation. *Trends Cell Biol*. 2008;18(8):389-96.
78. Bettencourt-Dias M, Glover DM. Centrosome biogenesis and function: centrosomes brings new understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(6):451-63.
79. Chretien D, Buendia B, Fuller SD, Karsenti E. Reconstruction of the centrosome cycle from cryoelectron micrographs. *J Struct Biol*. 1997;120(2):117-33.
80. Uzbekov R, Alieva I. Who are you, subdistal appendages of centriole? *Open biology*. 2018;8(7).
81. Brownlee CW, Rogers GC. Show me your license, please: deregulation of centriole duplication mechanisms that promote amplification. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(6):1021-34.
82. Ganem NJ, Godinho SA, Pellman D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature*. 2009;460(7252):278-82.
83. Wang WJ, Soni RK, Uryu K, Tsou MF. The conversion of centrioles to centrosomes: essential coupling of duplication with segregation. *J Cell Biol*. 2011;193(4):727-39.
84. Yang CH, Kasbek C, Majumder S, Yusof AM, Fisk HA. Mps1 phosphorylation sites regulate the function of centrin 2 in centriole assembly. *Mol Biol Cell*. 2010;21(24):4361-72.
85. Lukinavicius G, Lavogina D, Orpinell M, Umezawa K, Raymond L, Garin N, et al. Selective chemical crosslinking reveals a Cep57-Cep63-Cep152 centrosomal complex. *Current biology : CB*. 2013;23(3):265-70.
86. Tsuchiya Y, Yoshida S, Gupta A, Watanabe K, Kitagawa D. Cep295 is a conserved scaffold protein required for generation of a bona fide mother centriole. *Nature communications*. 2016;7:12567.



87. Kim TS, Park JE, Shukla A, Choi S, Murugan RN, Lee JH, et al. Hierarchical recruitment of Plk4 and regulation of centriole biogenesis by two centrosomal scaffolds, Cep192 and Cep152. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(50):E4849-57.
88. Sonnen KF, Gabryjonczyk AM, Anselm E, Stierhof YD, Nigg EA. Human Cep192 and Cep152 cooperate in Plk4 recruitment and centriole duplication. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 14):3223-33.
89. Guderian G, Westendorf J, Uldschmid A, Nigg EA. Plk4 trans-autophosphorylation regulates centriole number by controlling betaTrCP-mediated degradation. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 13):2163-9.
90. Sillibourne JE, Tack F, Vloemans N, Boeckx A, Thambirajah S, Bonnet P, et al. Autophosphorylation of polo-like kinase 4 and its role in centriole duplication. *Mol Biol Cell*. 2010;21(4):547-61.
91. Holland AJ, Lan W, Niessen S, Hoover H, Cleveland DW. Polo-like kinase 4 kinase activity limits centrosome overduplication by autoregulating its own stability. *The Journal of cell biology*. 2010;188(2):191-8.
92. Ohta M, Ashikawa T, Nozaki Y, Kozuka-Hata H, Goto H, Inagaki M, et al. Direct interaction of Plk4 with STIL ensures formation of a single procentriole per parental centriole. *Nature communications*. 2014;5:5267.
93. Moyer TC, Clutario KM, Lambrus BG, Daggubati V, Holland AJ. Binding of STIL to Plk4 activates kinase activity to promote centriole assembly. *J Cell Biol*. 2015;209(6):863-78.
94. Tang CJ, Lin SY, Hsu WB, Lin YN, Wu CT, Lin YC, et al. The human microcephaly protein STIL interacts with CPAP and is required for procentriole formation. *The EMBO journal*. 2011;30(23):4790-804.
95. Hirono M. Cartwheel assembly. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2014;369(1650).
96. Hilbert M, Noga A, Frey D, Hamel V, Guichard P, Kraatz SH, et al. SAS-6 engineering reveals interdependence between cartwheel and microtubules in determining centriole architecture. *Nature cell biology*. 2016;18(4):393-403.
97. Kitagawa D, Vakonakis I, Olieric N, Hilbert M, Keller D, Olieric V, et al. Structural basis of the 9-fold symmetry of centrioles. *Cell*. 2011;144(3):364-75.
98. Matsuura K, Lefebvre PA, Kamiya R, Hirono M. Bld10p, a novel protein essential for basal body assembly in *Chlamydomonas*: localization to the cartwheel, the first ninefold symmetrical structure appearing during assembly. *J Cell Biol*. 2004;165(5):663-71.
99. Carvalho-Santos Z, Machado P, Alvarez-Martins I, Gouveia SM, Jana SC, Duarte P, et al. BLD10/CEP135 is a microtubule-associated protein that controls the formation of the flagellum central microtubule pair. *Dev Cell*. 2012;23(2):412-24.
100. Kraatz S, Guichard P, Obbineni JM, Olieric N, Hatzopoulos GN, Hilbert M, et al. The Human Centriolar Protein CEP135 Contains a Two-Stranded Coiled-Coil Domain Critical for Microtubule Binding. *Structure*. 2016;24(8):1358-71.
101. Lin YC, Chang CW, Hsu WB, Tang CJ, Lin YN, Chou EJ, et al. Human microcephaly protein CEP135 binds to hSAS-6 and CPAP, and is required for centriole assembly. *The EMBO journal*. 2013;32(8):1141-54.
102. Sharma A, Aher A, Dynes NJ, Frey D, Katrukha EA, Jaussi R, et al. Centriolar CPAP/SAS-4 Imparts Slow Processive Microtubule Growth. *Dev Cell*. 2016;37(4):362-76.
103. Zheng X, Ramani A, Soni K, Gottardo M, Zheng S, Ming Gooi L, et al. Molecular basis for CPAP-tubulin interaction in controlling centriolar and ciliary length. *Nature communications*. 2016;7:11874.
104. Kohlmaier G, Loncarek J, Meng X, McEwen BF, Mogensen MM, Spektor A, et al. Overly long centrioles and defective cell division upon excess of the SAS-4-related protein CPAP. *Current biology : CB*. 2009;19(12):1012-8.

105. Schmidt TI, Kleylein-Sohn J, Westendorf J, Le Clech M, Lavoie SB, Stierhof YD, et al. Control of centriole length by CPAP and CP110. *Current biology : CB.* 2009;19(12):1005-11.
106. Tang CJ, Fu RH, Wu KS, Hsu WB, Tang TK. CPAP is a cell-cycle regulated protein that controls centriole length. *Nature cell biology.* 2009;11(7):825-31.
107. Comartin D, Gupta GD, Fussner E, Coyaud E, Hasegan M, Archinti M, et al. CEP120 and SPICE1 cooperate with CPAP in centriole elongation. *Current biology : CB.* 2013;23(14):1360-6.
108. Keller LC, Geimer S, Romijn E, Yates J, 3rd, Zamora I, Marshall WF. Molecular architecture of the centriole proteome: the conserved WD40 domain protein POC1 is required for centriole duplication and length control. *Mol Biol Cell.* 2009;20(4):1150-66.
109. Gudi R, Haycraft CJ, Bell PD, Li Z, Vasu C. Centrobin-mediated regulation of the centrosomal protein 4.1-associated protein (CPAP) level limits centriole length during elongation stage. *The Journal of biological chemistry.* 2015;290(11):6890-902.
110. Gudi R, Zou C, Li J, Gao Q. Centrobin-tubulin interaction is required for centriole elongation and stability. *J Cell Biol.* 2011;193(4):711-25.
111. Gudi R, Zou C, Dhar J, Gao Q, Vasu C. Centrobin-centrosomal protein 4.1-associated protein (CPAP) interaction promotes CPAP localization to the centrioles during centriole duplication. *The Journal of biological chemistry.* 2014;289(22):15166-78.
112. Azimzadeh J, Hergert P, Delouvee A, Euteneuer U, Formstecher E, Khodjakov A, et al. hPOC5 is a centrin-binding protein required for assembly of full-length centrioles. *J Cell Biol.* 2009;185(1):101-14.
113. Singla V, Romaguera-Ros M, Garcia-Verdugo JM, Reiter JF. Odf1, a human disease gene, regulates the length and distal structure of centrioles. *Dev Cell.* 2010;18(3):410-24.
114. Kobayashi T, Tsang WY, Li J, Lane W, Dynlacht BD. Centriolar kinesin Kif24 interacts with CP110 to remodel microtubules and regulate ciliogenesis. *Cell.* 2011;145(6):914-25.
115. Li J, D'Angiolella V, Seeley ES, Kim S, Kobayashi T, Fu W, et al. USP33 regulates centrosome biogenesis via deubiquitination of the centriolar protein CP110. *Nature.* 2013;495(7440):255-9.
116. Chang J, Cizmecioglu O, Hoffmann I, Rhee K. PLK2 phosphorylation is critical for CPAP function in procentriole formation during the centrosome cycle. *The EMBO journal.* 2010;29(14):2395-406.
117. Watanabe K, Takao D, Ito KK, Takahashi M, Kitagawa D. The Cep57-pericentrin module organizes PCM expansion and centriole engagement. *Nature communications.* 2019;10(1):931.
118. Santamaria A, Wang B, Elowe S, Malik R, Zhang F, Bauer M, et al. The Plk1-dependent phosphoproteome of the early mitotic spindle. *Molecular & cellular proteomics : MCP.* 2011;10(1):M110 004457.
119. Zimmerman WC, Sillibourne J, Rosa J, Doxsey SJ. Mitosis-specific anchoring of gamma tubulin complexes by pericentrin controls spindle organization and mitotic entry. *Mol Biol Cell.* 2004;15(8):3642-57.
120. Thawani A, Rale MJ, Coudray N, Bhabha G, Stone HA, Shaevitz JW, et al. The transition state and regulation of gamma-TuRC-mediated microtubule nucleation revealed by single molecule microscopy. *eLife.* 2020;9.
121. Liu P, Zupa E, Neuner A, Bohler A, Loerke J, Flemming D, et al. Insights into the assembly and activation of the microtubule nucleator gamma-TuRC. *Nature.* 2020;578(7795):467-71.
122. Luders J, Patel UK, Stearns T. GCP-WD is a gamma-tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. *Nature cell biology.* 2006;8(2):137-47.

123. Haren L, Remy MH, Bazin I, Callebaut I, Wright M, Merdes A. NEDD1-dependent recruitment of the gamma-tubulin ring complex to the centrosome is necessary for centriole duplication and spindle assembly. *J Cell Biol.* 2006;172(4):505-15.
124. Zhang X, Chen Q, Feng J, Hou J, Yang F, Liu J, et al. Sequential phosphorylation of Nedd1 by Cdk1 and Plk1 is required for targeting of the gammaTuRC to the centrosome. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 13):2240-51.
125. Lee K, Rhee K. PLK1 phosphorylation of pericentrin initiates centrosome maturation at the onset of mitosis. *J Cell Biol.* 2011;195(7):1093-101.
126. Gomez-Ferreria MA, Rath U, Buster DW, Chanda SK, Caldwell JS, Rines DR, et al. Human Cep192 is required for mitotic centrosome and spindle assembly. *Current biology : CB.* 2007;17(22):1960-6.
127. Zhu F, Lawo S, Bird A, Pinchev D, Ralph A, Richter C, et al. The mammalian SPD-2 ortholog Cep192 regulates centrosome biogenesis. *Current biology : CB.* 2008;18(2):136-41.
128. Haren L, Stearns T, Luders J. Plk1-dependent recruitment of gamma-tubulin complexes to mitotic centrosomes involves multiple PCM components. *PloS one.* 2009;4(6):e5976.
129. Fong KW, Choi YK, Rattner JB, Qi RZ. CDK5RAP2 is a pericentriolar protein that functions in centrosomal attachment of the gamma-tubulin ring complex. *Mol Biol Cell.* 2008;19(1):115-25.
130. Lee S, Rhee K. CEP215 is involved in the dynein-dependent accumulation of pericentriolar matrix proteins for spindle pole formation. *Cell Cycle.* 2010;9(4):774-83.
131. Casenghi M, Meraldi P, Weinhart U, Duncan PI, Korner R, Nigg EA. Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev Cell.* 2003;5(1):113-25.
132. Casenghi M, Barr FA, Nigg EA. Phosphorylation of Nlp by Plk1 negatively regulates its dynein-dynactin-dependent targeting to the centrosome. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 21):5101-8.
133. Tsou MF, Wang WJ, George KA, Uryu K, Stearns T, Jallepalli PV. Polo kinase and separase regulate the mitotic licensing of centriole duplication in human cells. *Dev Cell.* 2009;17(3):344-54.
134. Loncarek J, Hergert P, Khodjakov A. Centriole reduplication during prolonged interphase requires procentriole maturation governed by Plk1. *Current biology : CB.* 2010;20(14):1277-82.
135. Hatano T, Sluder G. The interrelationship between APC/C and Plk1 activities in centriole disengagement. *Biology open.* 2012;1(11):1153-60.
136. Lacey KR, Jackson PK, Stearns T. Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(6):2817-22.
137. Hinchcliffe EH, Sluder G. "It takes two to tango": understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev.* 2001;15(10):1167-81.
138. Korzeniewski N, Treat B, Duensing S. The HPV-16 E7 oncoprotein induces centriole multiplication through deregulation of Polo-like kinase 4 expression. *Mol Cancer.* 2011;10:61.
139. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, et al. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell.* 2000;103(1):127-40.
140. Chen Z, Indjeian VB, McManus M, Wang L, Dynlacht BD. CP110, a cell cycle-dependent CDK substrate, regulates centrosome duplication in human cells. *Dev Cell.* 2002;3(3):339-50.
141. Winey M, Goetsch L, Baum P, Byers B. MPS1 and MPS2: novel yeast genes defining distinct steps of spindle pole body duplication. *J Cell Biol.* 1991;114(4):745-54.
142. Lindberg RA, Fischer WH, Hunter T. Characterization of a human protein threonine kinase isolated by screening an expression library with antibodies to phosphotyrosine. *Oncogene.* 1993;8(2):351-9.

143. Mills GB, Schmandt R, McGill M, Amendola A, Hill M, Jacobs K, et al. Expression of TTK, a novel human protein kinase, is associated with cell proliferation. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(22):16000-6.
144. Lauze E, Stoelcker B, Luca FC, Weiss E, Schutz AR, Winey M. Yeast spindle pole body duplication gene MPS1 encodes an essential dual specificity protein kinase. *The EMBO journal*. 1995;14(8):1655-63.
145. Lee S, Thebault P, Freschi L, Beauvils S, Blundell TL, Landry CR, et al. Characterization of spindle checkpoint kinase Mps1 reveals domain with functional and structural similarities to tetratricopeptide repeat motifs of Bub1 and BubR1 checkpoint kinases. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(8):5988-6001.
146. Nijenhuis W, von Castelmur E, Littler D, De Marco V, Tromer E, Vleugel M, et al. A TPR domain-containing N-terminal module of MPS1 is required for its kinetochore localization by Aurora B. *J Cell Biol*. 2013;201(2):217-31.
147. Ji Z, Gao H, Yu H. CELL DIVISION CYCLE. Kinetochore attachment sensed by competitive Mps1 and microtubule binding to Ndc80C. *Science*. 2015;348(6240):1260-4.
148. Gui P, Sedzro DM, Yuan X, Liu S, Hei M, Tian W, et al. Mps1 dimerization and multisite interactions with Ndc80 complex enable responsive spindle assembly checkpoint signaling. *Journal of molecular cell biology*. 2020.
149. Marquardt JR, Perkins JL, Beuoy KJ, Fisk HA. Modular elements of the TPR domain in the Mps1 N terminus differentially target Mps1 to the centrosome and kinetochore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(28):7828-33.
150. Chen Y, Riley DJ, Chen PL, Lee WH. HEC, a novel nuclear protein rich in leucine heptad repeats specifically involved in mitosis. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(10):6049-56.
151. Ciferri C, De Luca J, Monzani S, Ferrari KJ, Ristic D, Wyman C, et al. Architecture of the human ndc80-hec1 complex, a critical constituent of the outer kinetochore. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(32):29088-95.
152. Wei RR, Sorger PK, Harrison SC. Molecular organization of the Ndc80 complex, an essential kinetochore component. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(15):5363-7.
153. Zhu T, Dou Z, Qin B, Jin C, Wang X, Xu L, et al. Phosphorylation of microtubule-binding protein Hec1 by mitotic kinase Aurora B specifies spindle checkpoint kinase Mps1 signaling at the kinetochore. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(50):36149-59.
154. Hiruma Y, Sacristan C, Pachis ST, Adamopoulos A, Kuijt T, Ubbink M, et al. CELL DIVISION CYCLE. Competition between MPS1 and microtubules at kinetochores regulates spindle checkpoint signaling. *Science*. 2015;348(6240):1264-7.
155. Jelluma N, Brenkman AB, McLeod I, Yates JR, 3rd, Cleveland DW, Medema RH, et al. Chromosomal instability by inefficient Mps1 auto-activation due to a weakened mitotic checkpoint and lagging chromosomes. *PLoS one*. 2008;3(6):e2415.
156. Kang J, Chen Y, Zhao Y, Yu H. Autophosphorylation-dependent activation of human Mps1 is required for the spindle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(51):20232-7.
157. Mattison CP, Old WM, Steiner E, Huneycutt BJ, Resing KA, Ahn NG, et al. Mps1 activation loop autophosphorylation enhances kinase activity. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(42):30553-61.
158. Yamagishi Y, Yang CH, Tanno Y, Watanabe Y. MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components. *Nature cell biology*. 2012;14(7):746-52.
159. Overlack K, Primorac I, Vleugel M, Krenn V, Maffini S, Hoffmann I, et al. A molecular basis for the differential roles of Bub1 and BubR1 in the spindle assembly checkpoint. *eLife*. 2015;4:e05269.



160. Vleugel M, Tromer E, Omerzu M, Groenewold V, Nijenhuis W, Snel B, et al. Arrayed BUB recruitment modules in the kinetochore scaffold KNL1 promote accurate chromosome segregation. *J Cell Biol.* 2013;203(6):943-55.
161. Moyle MW, Kim T, Hattersley N, Espeut J, Cheerambathur DK, Oegema K, et al. A Bub1-Mad1 interaction targets the Mad1-Mad2 complex to unattached kinetochores to initiate the spindle checkpoint. *J Cell Biol.* 2014;204(5):647-57.
162. Primorac I, Weir JR, Chiroli E, Gross F, Hoffmann I, van Gerwen S, et al. Bub3 reads phosphorylated MELT repeats to promote spindle assembly checkpoint signaling. *eLife.* 2013;2:e01030.
163. London N, Biggins S. Mad1 kinetochore recruitment by Mps1-mediated phosphorylation of Bub1 signals the spindle checkpoint. *Genes Dev.* 2014;28(2):140-52.
164. Lischetti T, Zhang G, Sedgwick GG, Bolanos-Garcia VM, Nilsson J. The internal Cdc20 binding site in BubR1 facilitates both spindle assembly checkpoint signalling and silencing. *Nature communications.* 2014;5:5563.
165. Kasbek C, Yang CH, Yusof AM, Chapman HM, Winey M, Fisk HA. Preventing the degradation of mps1 at centrosomes is sufficient to cause centrosome reduplication in human cells. *Mol Biol Cell.* 2007;18(11):4457-69.
166. Majumder S, Slabodnick M, Pike A, Marquardt J, Fisk HA. VDAC3 regulates centriole assembly by targeting Mps1 to centrosomes. *Cell Cycle.* 2012;11(19):3666-78.
167. Kanai M, Ma Z, Izumi H, Kim SH, Mattison CP, Winey M, et al. Physical and functional interaction between mortalin and Mps1 kinase. *Genes Cells.* 2007;12(6):797-810.
168. Fabunmi RP, Wigley WC, Thomas PJ, DeMartino GN. Activity and regulation of the centrosome-associated proteasome. *The Journal of biological chemistry.* 2000;275(1):409-13.
169. Wigley WC, Fabunmi RP, Lee MG, Marino CR, Muallem S, DeMartino GN, et al. Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J Cell Biol.* 1999;145(3):481-90.
170. Hames RS, Crookes RE, Straatman KR, Merdes A, Hayes MJ, Faragher AJ, et al. Dynamic recruitment of Nek2 kinase to the centrosome involves microtubules, PCM-1, and localized proteasomal degradation. *Mol Biol Cell.* 2005;16(4):1711-24.
171. Hames RS, Wattam SL, Yamano H, Bacchieri R, Fry AM. APC/C-mediated destruction of the centrosomal kinase Nek2A occurs in early mitosis and depends upon a cyclin A-type D-box. *The EMBO journal.* 2001;20(24):7117-27.
172. Rogers GC, Rusan NM, Roberts DM, Peifer M, Rogers SL. The SCF Slimb ubiquitin ligase regulates Plk4/Sak levels to block centriole reduplication. *J Cell Biol.* 2009;184(2):225-39.
173. Cunha-Ferreira I, Rodrigues-Martins A, Bento I, Riparbelli M, Zhang W, Laue E, et al. The SCF/Slimb ubiquitin ligase limits centrosome amplification through degradation of SAK/PLK4. *Current biology : CB.* 2009;19(1):43-9.
174. Coffino P. Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(3):188-94.
175. Li X, Coffino P. Degradation of ornithine decarboxylase: exposure of the C-terminal target by a polyamine-inducible inhibitory protein. *Molecular and cellular biology.* 1993;13(4):2377-83.
176. Ghoda L, van Daalen Wetters T, Macrae M, Ascherman D, Coffino P. Prevention of rapid intracellular degradation of ODC by a carboxyl-terminal truncation. *Science.* 1989;243(4897):1493-5.
177. Li X, Coffino P. Distinct domains of antizyme required for binding and proteolysis of ornithine decarboxylase. *Molecular and cellular biology.* 1994;14(1):87-92.
178. Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, et al. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature.* 1992;360(6404):597-9.

179. Mangold U, Hayakawa H, Coughlin M, Munger K, Zetter BR. Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation and its inhibitor localize to centrosomes and modulate centriole amplification. *Oncogene*. 2008;27(5):604-13.
180. Lin Y, Martin J, Gruendler C, Farley J, Meng X, Li BY, et al. A novel link between the proteasome pathway and the signal transduction pathway of the bone morphogenetic proteins (BMPs). *BMC cell biology*. 2002;3:15.
181. Gruendler C, Lin Y, Farley J, Wang T. Proteasomal degradation of Smad1 induced by bone morphogenetic proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(49):46533-43.
182. Newman RM, Mobascher A, Mangold U, Koike C, Diah S, Schmidt M, et al. Antizyme targets cyclin D1 for degradation. A novel mechanism for cell growth repression. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(40):41504-11.
183. Lim SK, Gopalan G. Antizyme1 mediates AURKAIP1-dependent degradation of Aurora-A. *Oncogene*. 2007;26(46):6593-603.
184. Lim SK, Gopalan G. Aurora-A kinase interacting protein 1 (AURKAIP1) promotes Aurora-A degradation through an alternative ubiquitin-independent pathway. *The Biochemical journal*. 2007;403(1):119-27.
185. Kasbek C, Yang CH, Fisk HA. Antizyme restrains centrosome amplification by regulating the accumulation of Mps1 at centrosomes. *Mol Biol Cell*. 2010;21(22):3878-89.
186. Jakobsen L, Vanselow K, Skogs M, Toyoda Y, Lundberg E, Poser I, et al. Novel asymmetrically localizing components of human centrosomes identified by complementary proteomics methods. *The EMBO journal*. 2011;30(8):1520-35.
187. Cui Y, Cheng X, Zhang C, Zhang Y, Li S, Wang C, et al. Degradation of the human mitotic checkpoint kinase Mps1 is cell cycle-regulated by APC-cCdc20 and APC-cCdh1 ubiquitin ligases. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(43):32988-98.
188. Morgan DO. The D box meets its match. *Molecular cell*. 2013;50(5):609-10.
189. Kwon M, Godinho SA, Chandhok NS, Ganem NJ, Azioune A, They M, et al. Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes Dev*. 2008;22(16):2189-203.
190. Quintyne NJ, Reing JE, Hoffelder DR, Gollin SM, Saunders WS. Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science*. 2005;307(5706):127-9.
191. Pihan GA. Centrosome dysfunction contributes to chromosome instability, chromoanagenesis, and genome reprogramming in cancer. *Front Oncol*. 2013;3:277.
192. Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, et al. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res*. 1998;58(17):3974-85.
193. Pihan GA, Wallace J, Zhou Y, Doxsey SJ. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res*. 2003;63(6):1398-404.
194. Duensing A, Liu Y, Perdreau SA, Kleylein-Sohn J, Nigg EA, Duensing S. Centriole overduplication through the concurrent formation of multiple daughter centrioles at single maternal templates. *Oncogene*. 2007;26(43):6280-8.
195. Duensing S, Duensing A, Crum CP, Munger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res*. 2001;61(6):2356-60.
196. Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonniyom S, Gonzalez S, et al. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(18):10002-7.
197. Guarguaglini G, Duncan PI, Stierhof YD, Holmstrom T, Duensing S, Nigg EA. The forkhead-associated domain protein Cep170 interacts with Polo-like kinase 1 and serves as a marker for mature centrioles. *Mol Biol Cell*. 2005;16(3):1095-107.
198. Duensing A, Ghanem L, Steinman RA, Liu Y, Duensing S. p21(Waf1/Cip1) deficiency stimulates centriole overduplication. *Cell Cycle*. 2006;5(24):2899-902.

199. Duensing A, Liu Y, Spardy N, Bartoli K, Tseng M, Kwon JA, et al. RNA polymerase II transcription is required for human papillomavirus type 16 E7- and hydroxyurea-induced centriole overduplication. *Oncogene*. 2007;26(2):215-23.
200. Duensing S, Munger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein can induce abnormal centrosome duplication through a mechanism independent of inactivation of retinoblastoma protein family members. *J Virol*. 2003;77(22):12331-5.
201. Duensing A, Liu Y, Tseng M, Malumbres M, Barbacid M, Duensing S. Cyclin-dependent kinase 2 is dispensable for normal centrosome duplication but required for oncogene-induced centrosome overduplication. *Oncogene*. 2006;25(20):2943-9.
202. Duensing S, Duensing A, Lee DC, Edwards KM, Piboonniyom SO, Manuel E, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor indirubin-3'-oxime selectively inhibits human papillomavirus type 16 E7-induced numerical centrosome anomalies. *Oncogene*. 2004;23(50):8206-15.
203. Duensing S, Munger K. Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability. *Oncogene*. 2002;21(40):6241-8.
204. Fisk HA, Mattison CP, Winey M. Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(25):14875-80.
205. Kasbek C, Yang CH, Fisk HA. Mps1 as a link between centrosomes and genomic instability. *Environ Mol Mutagen*. 2009;50(8):654-65.
206. Liu X, Winey M. The MPS1 family of protein kinases. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:561-85.
207. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic acids research*. 2005;33(Database issue):D34-8.
208. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*. 2012;13:134.
209. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
210. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):671-5.
211. The UniProt C. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research*. 2017;45(D1):D158-D69.
212. Petersen B, Petersen TN, Andersen P, Nielsen M, Lundegaard C. A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC structural biology*. 2009;9:51.
213. Xue Y, Ren J, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X. GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2008;7(9):1598-608.
214. Srinivas V, Kitagawa M, Wong J, Liao PJ, Lee SH. The Tumor Suppressor Cdkn3 Is Required for Maintaining the Proper Number of Centrosomes by Regulating the Centrosomal Stability of Mps1. *Cell reports*. 2015;13(8):1569-77.
215. Crook T, Wrede D, Vousden KH. p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene*. 1991;6(5):873-5.
216. Paoletti A, Moudjou M, Paintrand M, Salisbury JL, Bornens M. Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *Journal of cell science*. 1996;109 ( Pt 13):3089-102.
217. Fuller SD, Gowen BE, Reinsch S, Sawyer A, Buendia B, Wepf R, et al. The core of the mammalian centriole contains gamma-tubulin. *Current biology : CB*. 1995;5(12):1384-93.
218. Tannous BA, Kerami M, Van der Stoop PM, Kwiatkowski N, Wang J, Zhou W, et al. Effects of the selective MPS1 inhibitor MPS1-IN-3 on glioblastoma sensitivity to antimetabolic drugs. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013;105(17):1322-31.

219. Cimini D, Howell B, Maddox P, Khodjakov A, Degrossi F, Salmon ED. Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *The Journal of cell biology*. 2001;153(3):517-27.
220. Silkworth WT, Nardi IK, Scholl LM, Cimini D. Multipolar spindle pole coalescence is a major source of kinetochore mis-attachment and chromosome mis-segregation in cancer cells. *PloS one*. 2009;4(8):e6564.
221. Lingle WL, Lutz WH, Ingle JN, Maihle NJ, Salisbury JL. Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(6):2950-5.
222. Hsu LC, Kapali M, DeLoia JA, Gallion HH. Centrosome abnormalities in ovarian cancer. *International journal of cancer*. 2005;113(5):746-51.
223. Sato N, Mizumoto K, Nakamura M, Nakamura K, Kusumoto M, Niiyama H, et al. Centrosome abnormalities in pancreatic ductal carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1999;5(5):963-70.
224. Kramer A, Neben K, Ho AD. Centrosome aberrations in hematological malignancies. *Cell biology international*. 2005;29(5):375-83.
225. Hogg D, Guidos C, Bailey D, Amendola A, Groves T, Davidson J, et al. Cell cycle dependent regulation of the protein kinase TTK. *Oncogene*. 1994;9(1):89-96.
226. Litovchick L, Sadasivam S, Florens L, Zhu X, Swanson SK, Velmurugan S, et al. Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in quiescence. *Molecular cell*. 2007;26(4):539-51.
227. Fischer M, Quaas M, Steiner L, Engeland K. The p53-p21-DREAM-CDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes. *Nucleic acids research*. 2016;44(1):164-74.
228. Muller GA, Wintsche A, Stangner K, Prohaska SJ, Stadler PF, Engeland K. The CHR site: definition and genome-wide identification of a cell cycle transcriptional element. *Nucleic acids research*. 2014;42(16):10331-50.
229. Sadasivam S, Duan S, DeCaprio JA. The MuvB complex sequentially recruits B-Myb and FoxM1 to promote mitotic gene expression. *Genes & development*. 2012;26(5):474-89.
230. Schmit F, Korenjak M, Mannefeld M, Schmitt K, Franke C, von Eyss B, et al. LINC, a human complex that is related to pRB-containing complexes in invertebrates regulates the expression of G2/M genes. *Cell cycle*. 2007;6(15):1903-13.
231. Muller GA, Quaas M, Schumann M, Krause E, Padi M, Fischer M, et al. The CHR promoter element controls cell cycle-dependent gene transcription and binds the DREAM and MMB complexes. *Nucleic acids research*. 2012;40(4):1561-78.
232. Ren B, Cam H, Takahashi Y, Volkert T, Terragni J, Young RA, et al. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes & development*. 2002;16(2):245-56.
233. McLaughlin-Drubin ME, Huh KW, Munger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6. *Journal of virology*. 2008;82(17):8695-705.
234. Nor Rashid N, Yusof R, Watson RJ. Disruption of pocket protein dream complexes by E7 proteins of different types of human papillomaviruses. *Acta virologica*. 2013;57(4):447-51.
235. Pang CL, Toh SY, He P, Teissier S, Ben Khalifa Y, Xue Y, et al. A functional interaction of E7 with B-Myb-MuvB complex promotes acute cooperative transcriptional activation of both S- and M-phase genes. (129 c). *Oncogene*. 2014;33(31):4039-49.
236. Lam EW, Morris JD, Davies R, Crook T, Watson RJ, Vousden KH. HPV16 E7 oncoprotein deregulates B-myb expression: correlation with targeting of p107/E2F complexes. *The EMBO journal*. 1994;13(4):871-8.
237. Yamashita Y, Kajigaya S, Yoshida K, Ueno S, Ota J, Ohmine K, et al. Sak serine-threonine kinase acts as an effector of Tec tyrosine kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(42):39012-20.

238. Klebba JE, Buster DW, McLamarrah TA, Rusan NM, Rogers GC. Autoinhibition and relief mechanism for Polo-like kinase 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(7):E657-66.
239. Thebault P, Chirgadze DY, Dou Z, Blundell TL, Elowe S, Bolanos-Garcia VM. Structural and functional insights into the role of the N-terminal Mps1 TPR domain in the SAC (spindle assembly checkpoint). *The Biochemical journal*. 2012;448(3):321-8.
240. Dhayalan A, Kudithipudi S, Rathert P, Jeltsch A. Specificity analysis-based identification of new methylation targets of the SET7/9 protein lysine methyltransferase. *Chemistry & biology*. 2011;18(1):111-20.
241. Biggar KK, Li SS. Non-histone protein methylation as a regulator of cellular signalling and function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2015;16(1):5-17.
242. Tyler RK, Chu ML, Johnson H, McKenzie EA, Gaskell SJ, Eyers PA. Phosphoregulation of human Mps1 kinase. *The Biochemical journal*. 2009;417(1):173-81.
243. von Schubert C, Cubizolles F, Bracher JM, Sliedrecht T, Kops G, Nigg EA. Plk1 and Mps1 Cooperatively Regulate the Spindle Assembly Checkpoint in Human Cells. *Cell reports*. 2015;12(1):66-78.