

**La regulación del Ciclo Celular:
Modelos Experimentales sencillos
que resultan en Premios Nobel**

AGUSTÍN G. ZAPATA

*Departamento de Biología Celular.- Facultad de Biología.-
Universidad Complutense de Madrid*

Sr. Presidente, Sres. Académicos, Señoras y Señores: Fue para mí un honor aceptar estar aquí esta tarde compartiendo esta sesión extraordinaria sobre los Premios Nobel 2001. Hoy el honor es mayor, si cabe, cuando encuentro aquí tantos compañeros y amigos y recuerdo el día del discurso de entrada a esta Academia de mi maestro el Prof. Carrato. El sillón de D. Alfredo fue, además, merecidamente ocupado por el Prof. Juan Ramón Lacadena, coordinador de esta sesión extraordinaria, también profesor y amigo, quien igualmente me enseñó muchas cosas del mundo académico.

La primera dificultad esta noche es condensar en 45 minutos la ingente cantidad de datos que conocemos en la actualidad acerca del control del ciclo celular. Lo intentaré repasando muy someramente la historia de los descubrimientos acerca del ciclo hasta las aportaciones realizadas en los años 80 por los ganadores del Nobel de Medicina y Fisiología 2001, para terminar centrándome en los aspectos más actuales del problema.

¿Cuáles son las características del ciclo celular?. Durante el ciclo celular se produce primero, durante la llamada fase S, la duplicación y posteriormente (fase M) la separación del material hereditario. El ciclo está regulado de tal manera que existen controles para el inicio de cada una de sus fases y mecanismos para compensar los posibles errores cometidos en su ejecución. Por otro lado, la base molecular de esos controles está fuertemente conservada desde los eucariotas unicelulares hasta el hombre.

Evolución del conocimiento acerca del ciclo celular

La primera imagen que nos viene a la memoria cuando pensamos en el ciclo celular son los cambios sufridos por núcleo y cromosomas a lo largo del mismo. No es extraño que los avances de la microscopía permitieran ya a principios del siglo XX tener una imagen descriptiva de la alternancia de fases en el núcleo celular.

En los años 50, técnicas de microespectrometría y autorradiografía permitirían demostrar que la duplicación del ADN ocurre en las células eucarióticas en un periodo concreto del ciclo celular que llamamos fase S. Este descubrimiento abría dos interrogantes sobre las que seguimos preguntándonos todavía: ¿cómo funciona la maquinaria de replicación del ADN? y ¿qué determina el inicio de la fase S durante el ciclo celular?. Respecto del primer interrogante los datos se han acumulado en los últimos 50 años y muchos de los elementos implicados en la replicación del ADN son ahora conocidos, como la necesidad de “primers” de ARN para la iniciación de la síntesis de ADN, o la participación en ella de multitud de sistemas enzimáticos como ADN polimerasas, topoisomerasas, helicasas, ligasas, primasas, etc.

También los datos sobre la otra fase del ciclo celular, la mitosis (fase M) se han ido acumulando a lo largo del siglo XX. Ya a principios de ese siglo Boveri había descrito el huso mitótico, que la microscopía electrónica demostraría estaba formado por microtúbulos, compuestos a su vez de subunidades de tubulina. Pronto conoceríamos el papel jugado en la mitosis por los llamados centros organizadores microtubulares (cineatócoros y centrosomas o centriolos) capaces de organizar microtúbulos nuevos y de estabilizar otros impidiendo su degradación. Estos, junto con

motores microtubulares presentes en el huso mitótico permiten el movimiento de los cromosomas hasta los dos polos del huso, aprovechando la capacidad de los microtúbulos de sufrir ciclos de elongación y acortamiento de acuerdo al modelo de la inestabilidad dinámica.

Estos resultados permitieron una descripción clara de la división celular:

- a) Al final de interfase (fase G₂) la duplicación y separación de los centrómeros crea un huso mitótico que establece una bipolaridad en la célula.
- b) Los cromosomas se condensan organizándose en dos cromátidas hermanas cada una de ellas con un cinetócoro.
- c) Los cromosomas se estabilizan sobre el huso sólo cuando un cinetócoro engancha los microtúbulos que emergen de un polo y el otro los del otro polo. De esta forma, las cromátidas quedan orientadas hacia polos opuestos de la célula.
- d) La cohesión de las cromátidas desaparece y éstas se dirigen hacia los dos polos de la célula.
- e) Las células hijas se separan definitivamente cuando la célula sufre citocinesis.

El control del ciclo celular: Las aportaciones de Hartwell, Nurse y Hunt

Más relevante que los datos que, de manera más o menos detallada, describen las etapas del ciclo celular y los elementos celulares implicados en ellas es la evolución que han sufrido los conceptos acerca del fenómeno en sí. Precisamente fueron las contribuciones de los científicos galardonados con los premios Nobel de este año las que sentaron las bases conceptuales del ciclo celular que podemos resumir en cinco puntos:

- 1) El ciclo celular puede considerarse como una secuencia de acontecimientos organizados temporalmente.
- 2) El inicio de cada uno de ellos es consecuencia de la finalización de los anteriores.

- 3) La relación entre unos acontecimientos y otros se establece directamente o a través de algún tipo de señales.
- 4) La necesidad “de conocer” la finalización de una etapa para comenzar la siguiente conlleva la existencia de controles a lo largo del ciclo.
- 5) Ciertos acontecimientos actúan como limitantes para la progresión del ciclo.

El primer acierto de los investigadores que llegaron a todas estas conclusiones fue la elección del material utilizado en la investigación. Por un lado, se utilizaron eucariotas primitivos, donde el análisis genético era relativamente fácil, lo que permitió obtener mutantes con alteraciones en algún estadio del ciclo, caracterizar por complementación los genes implicados, clonarlos y analizarlos bioquímicamente. Por otro lado, se aislaron y caracterizaron extractos celulares derivados de oocitos o cigotos de anfibios o invertebrados marinos capaces de inducir *in situ* la consecución de distintas etapas del ciclo celular.

Leland Hartwell, en la actualidad Presidente y Director del Fred Hutchinson Cancer Research Center de Seattle, obtuvo más de cien mutantes en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que bloqueaban el ciclo en distintos puntos del mismo. Además, demostró la estrecha relación existente entre los acontecimientos controlados por los genes mutados y el inicio de las distintas etapas del ciclo. Así, el producto del gen CDC28, “start”, estaba implicado en el inicio de la replicación del ADN. Hartwell enunció también la necesidad de completar tales acontecimientos para iniciar las siguientes etapas del ciclo celular, identificando a finales de los años 80 los primeros genes implicados en los llamados “puntos de control” (“checkpoints”) del ciclo.

De manera independiente, Paul Nurse, a la sazón actual Director General de la Imperial Cancer Research Foundation de Londres obtuvo mutantes de ciclo en otra especie de levadura, *Schistosaccharomyces pombe*. Uno de ellos, que denominó cdc 2, resultó ser homólogo del CDC28 identificado por Hartwell en *S. cerevisiae*. Nurse lograría demostrar que ambos genes codificaban quinasas (que luego llamaríamos Cdks, quinasas dependientes de ciclinas) que influían el ciclo celular a través de la fosforilación de distintos sustratos. Todavía más importante fue la identifica-

ción y caracterización en 1987 de un gen equivalente, CDK1, en células humanas. Este descubrimiento implicaba que estábamos ante genes fundamentales para la regulación del ciclo celular que funcionaban en todas las células eucarióticas validando de este modo el modelo experimental utilizado por los autores. De aquí, mi título para esta conferencia que quiere resaltar la validez de los modelos experimentales para analizar problemas de gran trascendencia biomédica y que, como en este caso “pueden resultar, a la postre, en premios Nobel”.

El tercer “actor” de esta historia, Tim Hunt, como Nurse en la Imperial Cancer Research Foundation, identificó y caracterizó moléculas implicadas en el control del ciclo en huevos fertilizados de anfibios y erizos de mar. Esas moléculas resultarían ser las llamadas ciclinas que regulaban la actividad de las Cdks.

Es importante reconocer aquí que en los años 70 Yushio Masui había descrito un Factor Promotor de la Maduración (MPF) que hacía que huevos fertilizados de *Xenopus* iniciaran su primera división. Dicho factor estaba compuesto por dos proteínas: una ciclina y una proteína de 34kd idéntica al producto del gen Cdc2 descrito por Nurse. Desgraciadamente, el premio Nobel, cuyas reglas impiden que cada año lo reciban más de tres investigadores por campo, “se olvidó de estos descubrimientos pioneros de Masui”.

Control del ciclo celular por ciclinas y Cdks

La esencia del control del ciclo celular es, por tanto, el hecho de que distintos complejos Cdks-ciclinas controlan el inicio de las fases S y M. Hemos de recordar aquí, que el número de ciclinas identificadas es distinto en eucariotas inferiores y superiores y como la utilización de distintas nomenclaturas hace a veces difícil la comparación de la condición en unos y otros organismos.

Las actividades de las Cdks están reguladas por 3 mecanismos generales:

- 1) La disponibilidad de las ciclinas
- 2) Los cambios en los niveles de fosforilación de sus puntos catalíticos (mediados por Cdc 25 y Wee 1)

3) Su asociación con proteínas inhibidoras (CKIs)

Disponibilidad de las ciclinas

A su vez, la disponibilidad de las ciclinas depende de :

- su ubicación en núcleo o citoplasma
- la regulación de su síntesis y
- la regulación de su degradación.

La presencia de ciclinas (y otras moléculas implicadas en la regulación del ciclo) en el núcleo varía a lo largo del ciclo y del tipo de ciclina de que se trate::

- 1) En G1 se sintetizan las ciclinas A, E y D, uniéndose a continuación a sus Cdks respectivas. Los complejos formados por las Cdks y las ciclinas A, E y D1 se importan y concentran en el núcleo, mientras que el complejo formado por Cdk6-ciclina D3 se localiza tanto en núcleo como en citoplasma, aunque sólo es activo en el primero.
- 2) Al entrar en S, los complejos Cdks-ciclina A y E permanecen en el núcleo, mientras el formado por Cdk-ciclina D1 sale del núcleo y es degradado.
- 3) Los complejos Cdk2-ciclina A y cdc2-ciclina A se mantienen en el núcleo hasta su degradación durante la fase M.
- 4) La ciclina B1, por su parte, que une cdc2 predomina en el citoplasma porque su reimportación al mismo es más rápida que su entrada al núcleo.
- 5) La ciclina B2 también es predominantemente citoplásmica pero en este caso el hecho se debe a que posiblemente esté asociada a algún componente de ese compartimento.
- 6) Finalmente, dos moléculas reguladoras de la actividad de los complejos ciclina / Cdks, Wee 1 y Cdc 25C (ver luego) tienen comportamientos distintos:
 - Wee 1 es siempre nuclear, mientras

- Cdc 25C permanece en el citoplasma unida a la proteína 14-3-3 durante toda la interfase, entrando súbitamente al núcleo inmediatamente antes de la fase M.

También los mecanismos de control de la síntesis de ciclinas varían de unas familias a otras. En el caso de las ciclinas D, cuya presencia mantenida es necesaria para la progresión del ciclo a lo largo de G1, a pesar de la fuerte homología de la familia, la expresión de distintos miembros de la misma en diferentes tejidos es muy distinta, lo que presumiblemente refleja diferencias en los elementos reguladores de la transcripción de sus genes. Entre estos elementos están: c-myc, AP-1 y NF- κ B. Por el contrario, la expresión de la ciclina E es más cíclica, comenzando a acumularse al final de G1, para alcanzar un máximo en la transición G1/S y descender a partir de S. En este caso, el principal regulador de la síntesis de ciclina E es el factor de transcripción E2-F.

El proceso de degradación de las ciclinas, como el de otras muchas moléculas implicadas en el ciclo celular, acontece en el proteosoma 26S tras ubiquitinización dependiente de fosforilación. Se trata de un proceso secuencial iniciado por un denominado complejo E que consta de: una enzima activante de la ubiquitinasa (E1), otra conjugante de la ubiquitinasa (E2) y una ubiquitin-ligasa (E3).

A lo largo del ciclo actúan dos grandes complejos proteínicos de la familia de las ubiquitin-ligasas E3: SCF (Skp1-Cdc 53/cullin-Fbox protein) en interfase y APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) durante la mitosis.

El proceso es indudablemente más complicado porque:

- faltan por identificar muchos sustratos tanto de SCF como de APC/C,
- algunos de ellos no interaccionan directamente con los complejos y requieren moléculas adaptadoras como recientemente se demostraba en el caso de la degradación de la ciclina E-Cdk2. La regulación de este proceso es sumamente importante porque si la célula no dispone de suficiente ciclina E el ciclo se detiene en G1, mientras que si hay excesiva cantidad entra prematuramente en S generando inestabilidad genética y tumores. Entre la ciclina E y el complejo SCF, encargado

de su ubiquitinización, actúan adaptadores de la familia F-box (Fbw7 ó hCdc4 en células humanas; Archipelago-Ago-en *Drosophila*) que se unen a la ciclina E fosforilada facilitando su reconocimiento y unión a SCF.

Regulación inhibidora de las Cdks por fosforilación

La actividad de los complejos Cdk-ciclinas puede ser inhibida por fosforilación del punto catalítico de las Cdks. Esta fosforilación inhibitoria ha sido demostrada en la transición G2/M para Cdk1 y, menos concluyentemente, para Cdk2 y Cdk4. El proceso puede ser revertido por fosfatasas (Cdc 25A, B y C) que defosforilan la fosforilación inhibitoria de las Cdks. Así Cdc 25A defosforila y activa Cdk2 que es crítico para la respuesta G1 a daño al ADN (ver luego).

Inhibidores de las Cdks

Se trata de moléculas que se acumulan en momentos en los que la célula necesita dejar de dividir (veremos inmediatamente como una de estas moléculas p21 es clave para la detención del ciclo en G1 motivada por alteraciones en el ADN). Atendiendo a su estructura molecular y afinidad por las distintas Cdks, estos inhibidores se agrupan en dos grandes familias: Cip/Kip e INK4.

Cip/Kip son inhibidores de amplio espectro que pueden unirse, por ejemplo, tanto a la ciclina D-Cdk 4/6 como a la ciclina E/A-Cdk2, aunque la eficacia varía entre distintos miembros de la familia que incluye a: p21 (WAF1/CIP1); p27 (KIP1) y p57 (KIP2).

Las moléculas de la familia INK4 comparten un motivo estructural organizado sobre la base de cuatro (p15, p16) ó cinco (p18, p19) repeticiones de ankyrina y tienen un espectro de unión a Cdks limitado, uniéndose e inhibiendo solo a Cdk4 y Cdk6. La familia INK4 incluye los cuatro miembros antes mencionados: p15, p16, p18 y p19.

Puntos de control (checkpoints) interfásicos: Control de la replicación y reparación del ADN

Como antes enunciábamos, una de las características esenciales del control del ciclo celular es la existencia de mecanismos para conocer la fiabilidad del proceso y bloquearlo en el caso de que no se hayan realizado adecuadamente todos los procesos. Estos puntos de control garantizan esencialmente la replicación y reparación del ADN y la entrada y salida de la mitosis.

Durante la interfase, los puntos de control están regulados por dos familias de quinasas relacionadas con la familia de la fosfoinositol quinasa y quinasas que fosforilan en serina/treonina.

Las quinasas de la primera familia implicadas en el control del ciclo celular son las llamadas ATM (Ataxia-telangiectasia mutated) y ATR (ATM y Rad-3 related), aunque también se las conoce por otros nombres (Tel1, Mec1, Rac3 en *Saccharomyces*; o Mec 41 en *Drosophila*). ATM y ATR podrían formar un gran complejo molecular con proteínas implicadas en la reparación del ADN (Mre 11, MLH1, MSH2, MSH6) y en la remodelación de la cromatina (SWI/NSF). Las serinas/treonina quinasas implicadas en el control del ciclo son, por su parte, Chk1 y Chk2, aunque también se las conoce por otros nombres como Cds1 ó Rad 53.

Durante el intervalo entre G1 y S, ATM y ATR fosforilan directamente la proteína p53 en distintos residuos y a través de la quinasa Chk2 y otras rutas adicionales otros residuos. Además, ATM fosforila, inactivándola, Mdm 2 una ubiquitin ligasa necesaria para la degradación de p53. De esta manera, ATM y ATR activan y acumulan p53 lo que resulta en la activación de p21, un inhibidor del complejo Cdk2/ciclina E, lo que bloquea el ciclo.

Por otro lado, durante el paso de G2 a la mitosis, ATM y ATR fosforilan Chk2 y Chk1, respectivamente, quienes a su vez y de manera conjunta hacen lo propio con Cdc25C, responsable de la progresión a través de G2. La fosforilación y consiguiente inactivación de Cdc25C tiene dos consecuencias: facilita su unión al transportador p14-13-3 lo que re-

sulta en su salida del núcleo y secuestro en el citoplasma y bloquea la activación del complejo Cdc2/ciclina B y con ello la entrada en mitosis.

La regulación del ciclo celular durante la mitosis

Hemos descrito al comienzo de esta exposición los procesos fundamentales que acontecen durante la fase M. En los últimos años se han dedicado muchos esfuerzos a correlacionar esos datos morfológicos con los datos moleculares conocidos con posterioridad. Así, podríamos dividir ahora la mitosis en 5 fases sobre la base de la actividad de la Cdks y de la ubiquitin-ligasa E3, APC/C.

La primera fase corresponde al final de G2, justo antes de los primeros signos visibles de la condensación cromosómica. Este periodo parece regulado por Cdk-ciclina A (en organismos como levaduras en que no hay ciclina A, esta función la realizan otras como NIMA, CLB3 ó CLB5) que va aumentando a todo lo largo de G2 hasta alcanzar el máximo en el momento de la fragmentación de la envuelta nuclear. Así la inyección de ciclina A-Cdk en células en G2 induce rápidamente la condensación de la cromatina mientras que su inhibición impide que las células en G2 entren en profase y aquellas que están en profase temprana regresen a interfase. Por el contrario, como antes indicábamos, el complejo Cdk-ciclina B permanece inactivo en el citoplasma y otras quinasas se implican en los procesos preparatorios de la división celular. "Polo-like" quinasa parece necesaria para maduración de los centrosomas al final de G2 y para activar la Cdk1-ciclina B, y la Aurora B quinasa participa en la condensación de los cromosomas al fosforilar la histona H3.

En este estado, la entrada en mitosis puede ser también bloqueada por las moléculas implicadas en el control del daño/reparación del ADN como ATM y ATR o por la llamada proteína Chfr que controla la rotura de los microtúbulos. Cdk-ciclina A es presumiblemente el blanco de la acción de estas moléculas de control.

El compromiso definitivo con la mitosis implica la rápida activación de Cdk1-ciclina B que en eucariotas inferiores es constitutivamente nuclear pero en células superiores está en un equilibrio entrando y saliendo del núcleo como ya hemos repetidamente indicado. Al final de G2, sin

embargo, se acumula rápidamente en el núcleo fosforilándose su amino terminal.

Una vez que la célula se ha comprometido con la mitosis tiene una ó dos vías para impedir que se inicie. El punto clave en este proceso parece ser la unión de los cinetócoros a las fibras del huso. Errores en este proceso retrasan la mitosis a través de una cascada de señales mediada en parte por BubR1, Mad2 y otras proteínas que se concentran en los cinetócoros no unidos al huso. Esta vía impide finalmente que el APC destruya las proteínas que son necesarias para separar las cromátidas, iniciar la citocinesis y salir de la mitosis.

APC es activado por Cdk1-ciclina B pero también por otros cofactores como Cdc 20 (*fizzy*). Aparentemente el control de la unión de los cinetócoros al huso actúa sobre cdc 20 para impedir que APC destruya las moléculas responsables de mantener la cohesión de las cromátidas (*securina*) y la célula de mitosis (ciclina B). Una posibilidad es que los cinetócoros no asociados al huso actúen como puntos catalíticos para formar complejos Mad2-Cdc20, secuestrando así Cdc20 e impidiendo su unión al APC. Sin embargo, APC sí destruye la ciclina A poco después de la desaparición de la envuelta nuclear. Este doble comportamiento de APC podría ser consecuencia de una doble localización del complejo: las moléculas presentes en el citoplasma libre de microtúbulos podrían ser insensibles a este control y degradar la ciclina A, pero sí serlo aquellas moléculas asociadas al huso. Esta tercera etapa es, por tanto, equivalente al clásico estadio de prometáfase.

Una vez que todos los cinetócoros están unidos al huso cesa la inhibición de Cdc20 y la actividad catalítica de APC es total. Se inician entonces dos procesos:

- uno conducente a la destrucción de la securina que induce la separación de los cromosomas (lo que clásicamente inicia la anafase). Realmente la destrucción de la securina libera otra proteína –la proteasa separasa- que induce la separación de las cromátidas cortando un componente del complejo de la cohesina.
- otro conducente a la destrucción de la ciclina B que marca los cambios asociados con la telofase.

En las células embrionarias que tienen ciclos rápidos este proceso marca el final de la mitosis, pero en células somáticas hay todavía al menos una transición más importante para la salida de la mitosis y el establecimiento y la regulación de G1 antes de la replicación del ADN.

Durante esta fases, y una vez que la ciclina B se ha destruido y Cdk1 inactivado, Cdc20 es degradada y reemplazada por la llamada “Cdh1/Het1/fizzy-related protein” que, a su vez, parece aumentar el número de sustratos reconocidos por APC, incluyendo aquellos que llevan motivos “KEN-box” y “Destructin-box” (como la ciclina B y la securina), y la propia Cdc20, lo que hace que la proteólisis pase de ser ejercida por APC^{cdc20} a APC^{cdh1}. Así, esta APC^{cdh1} probablemente ayuda a coordinar los últimos acontecimientos mitóticos: el ensamble de una nueva envuelta nuclear alrededor de los dos grupos de cromosomas, la formación del denominado cuerpo medio entre los dos núcleos hijos y el inicio de la citocinesis. APC^{cdh1} permanece activa durante la interfase hasta que es fosforilada e inactivada por las quinasas que están implicadas en el compromiso de la célula con una nueva replicación del ADN.

Regulación del ciclo y transformación celular

Sin duda, el conocimiento de los mecanismos reguladores del ciclo celular de las células normales ha de ser clave tanto para conocer los mecanismos que dirigen la célula hacia su transformación maligna como para buscar nuevas dianas para el diseño de agentes anticancerígenos.

Pongo algunos ejemplos y con ello concluyo esta presentación. Como hemos visto, los niveles de ciclinas son fundamentales para la regulación del ciclo y en numerosos tumores hay sobre-expansión de ellas. El fenómeno no es, sin embargo, tan simple. Por ejemplo, la ciclina E se sobreexpresa en multitud de tumores, su transcripción es bloqueada por la proteína supresora de tumores pRb y otro supresor tumoral p27 bloquea la actividad del complejo Cdk2-ciclina E. Sin embargo, en ciertos tumores con altos niveles de ciclina E no hay amplificación del gen, ni un aumento de la cantidad o vida media de su ARN.

Modificaciones en las proteínas adaptadoras que regulan la degradación de la ciclina, como antes explicábamos, podrían explicar esos resultados. En este sentido, la expresión de un Ago mutado en *Drosophila* genera profundas modificaciones fenotípicas en el ojo y el ala de las moscas mutantes.

Por otro lado, sobre la base de que las células madre embrionarias de ratón son capaces de sufrir apoptosis la ausencia de p53 y de Chk1, las células tumorales que no tienen p53 pero no activan el programa apoptótico, podrían hacerlo si la vía de Chk1 fuera también inhibida. En este sentido, se están realizando “trials” en USA y Japón con UCN-01 porque en concentraciones nanomolares parece bloquear Chk1 u otra quinasa relacionada.

Sin duda, la complejidad es inmensa y por ello el camino a recorrer aún largo.

- BIBLIOGRAFÍA

- (1) BALTER & VOGEL (2001) *Science* 294: 502
- (2) BARTEK & LUCAS (2001) *Curr Op Cell Biol* 13: 738
- (3) BARTEK & LUKAS (2001) *Science* 294: 66
- (4) BURKE (2000) *Curr Op Genetics & Development* 10: 26
- (5) CERUTTI & SIMONIS (2000) *Curr Op Genetics & Development* 9: 65
- (6) CORTEZ & ELLEDGE (2000) *Nature* 406: 354
- (7) EKHOLM & REED (2000) *Curr Op Cell Biol* 12: 676
- (8) KARSENTI & VERNOS (2001) *Science* 294: 543
- (9) LEE & ORR-WEAVER (2001) *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 753
- (10) NASMYTH ET AL. (2000) *Science* 288: 1379
- (11) NURSE (2000) *Cell* 100: 71
- (12) PICKART (2001) *Annu Rev Biochem* 70: 503
- (13) PINES & RIEDER (2001) *Nature Cell Biol* 3: E3
- (14) ROBERTS (1999) *Cell* 98: 129

- (15) SCHWAB & TYERS (2001) *Nature* 413: 268
- (16) SHILOH (2001) *Curr Op Genetics & Development* 11: 71
- (17) TAKIZAWA & MORGAN (2000) *Curr Op Cell Biol* 12: 658
- (18) VODERMAIER (2001) *Curr Biol* 11: R834
- (19) WALWORTH (2000) *Curr Op Cell Biol* 12: 697
- (20) WASSMANN & BENEZARA (2001) *Curr Op Genetics & Development* 11: 83
- (21) YANG & KORNBLUTH (1999) *Trends Cell Biol* 9: 207.
- (22) HJHJ ZHOU & ELLEDGE (2000) *Nature* 408: 433