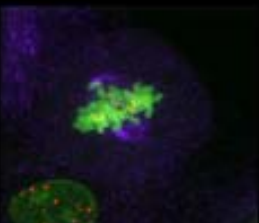
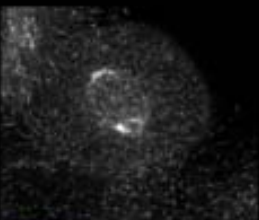
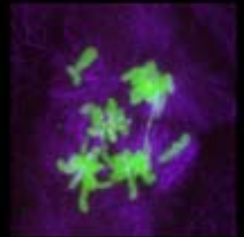
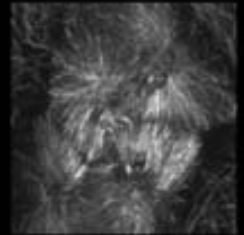
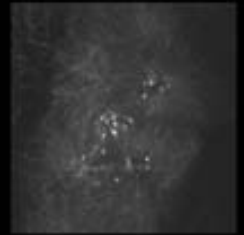


**LA DISFUNCIÓ TELOMÈRICA
COM A FONT D'INESTABILITAT
CROMOSÒMICA EN CÈL·LULES
EPITELIALS MAMÀRIES**



JUDIT PAMPALONA SALA
MAIG 2010

**LA DISFUNCIÓ TELOMÈRICA COM A FONT D'INESTABILITAT
CROMOSÒMICA EN CÈL·LULES EPITELIALS MAMÀRIES**

Memòria presentada per

Judit Pampalona Sala

Per optar al grau de

Doctora en Biologia Cel·lular

Tesi realitzada sota la direcció de la

Dra. Laura Tusell Padrós i la Dra. Anna Genescà Garrigosa

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

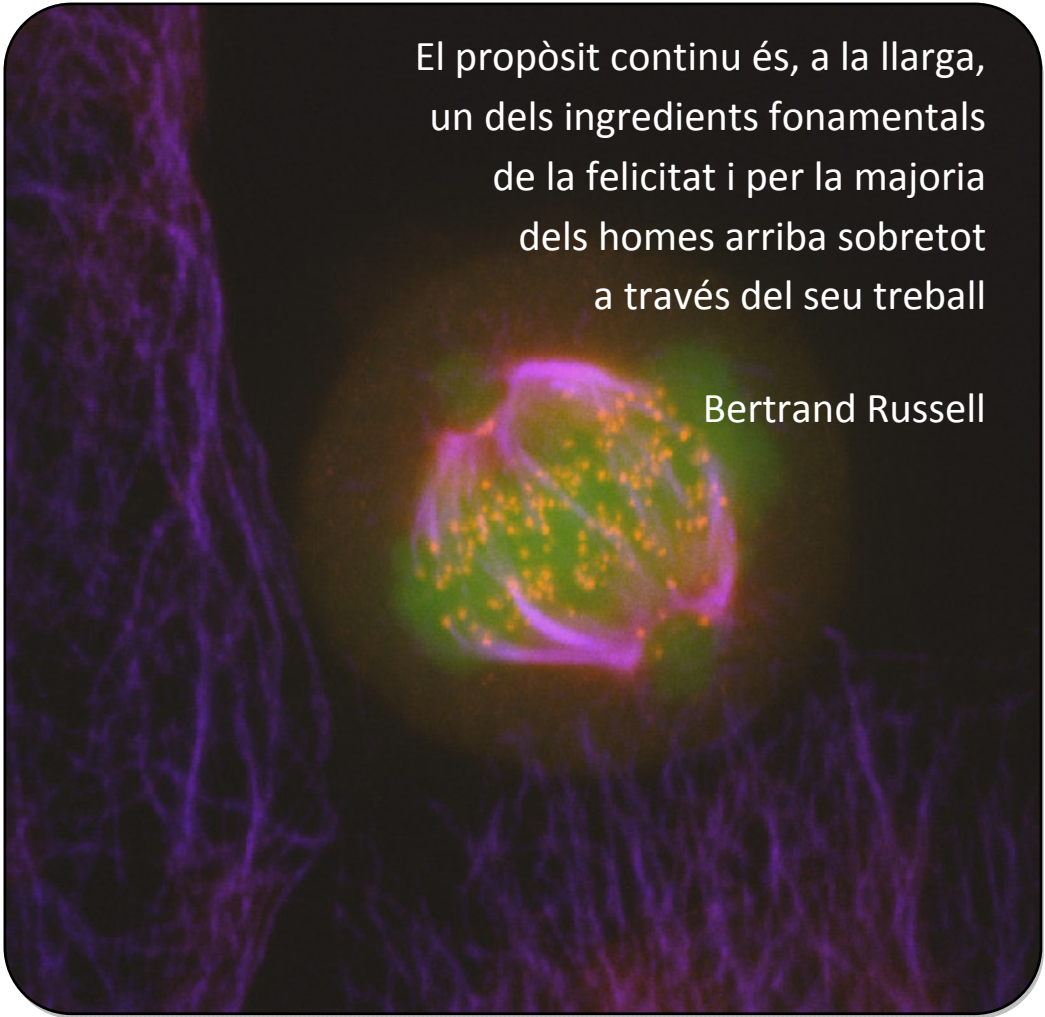
Facultat de Biociències

Universitat Autònoma de Barcelona

Judit Pampalona Sala Dra. Laura Tusell Padrós Dra. Anna Genescà Garrigosa

Universitat Autònoma de Barcelona
Cerdanyola del Vallès, Juny 2010

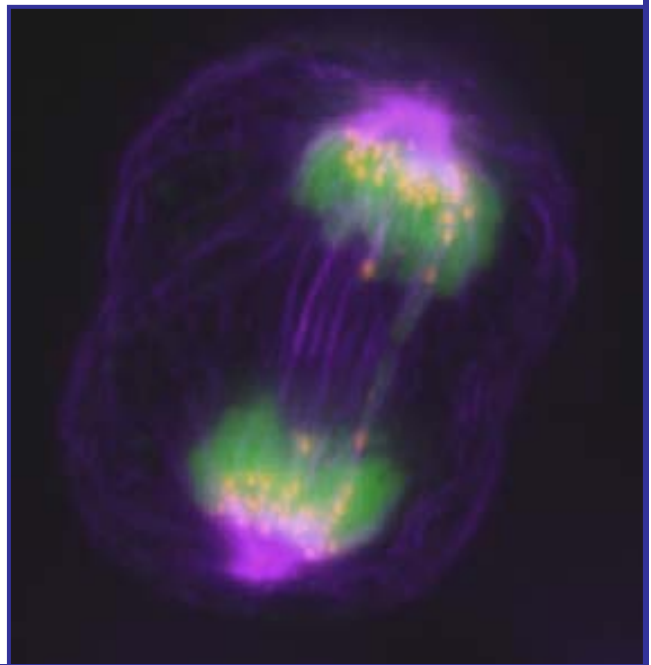
Al Ramon, a la Rosa i a l'Anna.
A la meva familia.



El propòsit continu és, a la llarga,
un dels ingredients fonamentals
de la felicitat i per la majoria
dels homes arriba sobretot
a través del seu treball

Bertrand Russell

Índex



ÍNDEX

RELACIÓ DE FIGURES, CAIXES I TAULES

GLOSSARI

INTRODUCCIÓ

1.1 Què és el càncer?	3
1.1.1 Teories sobre l'origen de les neoplàsies	4
1.1.2 Característiques de les cèl·lules tumorals	8
1.1.3 Els gens del càncer	11
1.2 Inestabilitat Genòmica i Càncer	14
1.2.1 Inestabilitat cromosòmica numèrica	16
1.2.2 Inestabilitat cromosòmica estructural	25
1.2.3 La inestabilitat cromosòmica i la seva avaluació	29
1.3 Els camins que condueixen a la inestabilitat del genoma durant el procés de carcinogènesi	32
1.3.1 Paper de l'aneuploïdia en el càncer	33
1.3.2 La importància de la poliploïdia en l'aparició de càncer	36
1.3.3 La importància de les reorganitzacions cromosòmiques en l'aparició del càncer	38
1.3.4 La importància de la disfunció telomèrica en l'aparició de càncer	39
1.4 Cèl·lules Epitelials Mamàries Humanes	47
1.4.1 Característiques del cultiu <i>in vitro</i> de les HMECs	48
1.4.2 Particularitats de les HMECs en la fase de post-selecció: CIN depenent d'erosió telomèrica	49
1.4.3 Les HMECs com a model d'estudi de la carcinogènesi mamària	50
HIPÒTESI I OBJECTIUS	
2. Hipòtesi i Objectius	55
1r Objectiu	55
2n Objectiu	56
3n Objectiu	56

TREBALLS REALITZATS

<i>TREBALL I</i>	59
<i>TREBALL II</i>	69
<i>TREBALL III</i>	83
<i>TREBALL IV</i>	97
<i>ANNEX DE RESULTATS</i>	113

DISCUSSIÓ

3.1 Disfunció telomèrica: a l'avantsala de l'aparició d'instabilitat cromosòmica 121

3.1.1 La disfunció telomèrica causa morfologies nuclears anòmales	121
3.1.2 La integritat del pont cromatínic i la generació d'aneuploidies: instabilitat cromosòmica de tipus numèrica (W-CIN)	125
3.1.3 El paper dels microtúbuls en la segregació de ponts anafàsics i la generació de W-CIN	127
3.1.4 <i>No hay dos sin tres</i> , els ponts anafàsics també poden bloquejar la citocinesi	131
3.1.5 Instabilitat cromosòmica deguda a disfunció telomèrica: la renovació dels cicles BFB	134

3.2 Disfunció telomèrica, instabilitat cromosòmica i càncer 135

3.2.1 De quin mal hem de morir: les conseqüències de la tetraploidització	136
3.2.2 Tetraploidies i desenvolupament tumoral	138

CONCLUSIONS

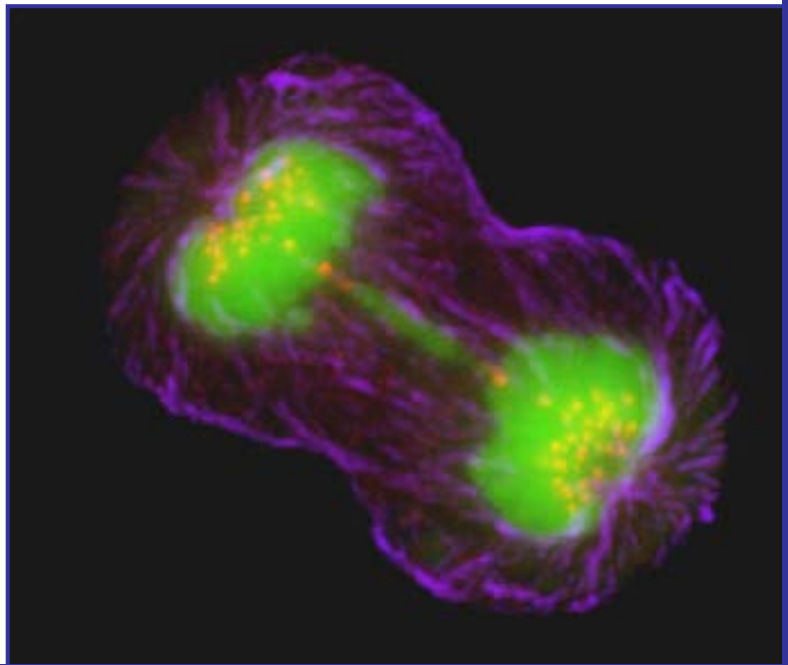
4. Conclusions 143

BIBLIOGRAFIA

5. Bibliografia 147

AGRAÏMENTS

***Relació de caixes,
figures i taules***



Introducció

- Caixa 1** Vies de senyalització relacionades amb p53 i pRb.
- Caixa 2** Inestabilitat en càncer colorectal.
- Caixa 3** Punt de control del fus.
- Caixa 4** Duplicació del centrosoma i el paper dels microtúbuls durant la mitosi.
- Caixa 5** Detecció de DSBs i reparació per les vies de HR i NHEJ.
- Caixa 6** Tècniques per mesurar la longitud telomèrica i detectar la presència de telòmers disfuncionals.
- Caixa 7** Problema de fi de replicació.

- Figura 1** Model clàssic de desenvolupament tumoral.
- Figura 2** Les cèl·lules mare tumorals en el desenvolupament del càncer.
- Figura 3** Tipus d'unions entre els microtúbuls i els cinetocors (MT-KT).
- Figura 4** Vies d'amplificació centrosòmica.
- Figura 5** Imatges de configuracions mitòtiques degudes a amplificació centrosòmica.
- Figura 6** L'amplificació de centrosomes pot conduir a una repartició desigual dels cromosomes.
- Figura 7** Els centrosomes es poden agrupar per formar fusos bipolars.
- Figura 8** A) Il·lustracions dels cromosomes de cèl·lules irradiades de blat de moro en anafase i telofase. B) Cicles fusió-pont-trencament.
- Figura 9** Patrons d'hibridació que indiquen W-CIN originada durant la última divisió.
- Figura 10** Representació d'un extrem telomèric.
- Figura 11** Fases del cultiu *in vitro* de fibroblasts.
- Figura 12** Hibridació *in situ* amb sondes pantelomèriques i pancentromèriques sobre cromosomes metafàsics.
- Figura 13** Fases del cultiu *in vitro* de les cèl·lules epitelials mamàries humanes.
- Figura 14** Esdeveniments que succeeixen a la glàndula mamària durant la carcinogènesi.

Treball I

- Figure 1** Analysis of abnormal nuclear morphologies in HMECs.
 - Figure 2** Chromatin bridges in HMECs.
 - Figure 3** (A) Distribution of telomere signal-free ends among chromosomes.
(B) Metaphase chromosomes hybridised with a pantelomeric and a pancentromeric PNA-probe
 - Figure 4** Involvement of chromosomes with eroded telomeres in ANMs.
 - Figure 5** Schematic representation of dic (1q;22p) segregation.
- Table 1** Abnormal nuclear morphologies resulting from broken NPBs.
- Table 2** Abnormal nuclear morphologies hybridised with the painting of chromosomes 1 and 22 at different population doublings (PDs).

Treball II

- Figure 1** Different types of aneuploidy can be detected by combining *in situ* hybridization with centromeric probes and the CBMN assay.
- Figure 2** Binucleated HMECs hybridized with a pancentromeric (green) and a pantelomeric (red) PNA probe.
- Figure 3** Distribution of (TTAGGG)*n* telomeric FISH signals among chromosome arms of HMECs at PD25 and PD36.
- Figure 4** Telomere-related aneuploidy throughout the HMEC culture.
- Figure 5** Images showing different missegregation patterns of selected chromosomes in HMECs.
- Figure 6** Diagram showing possible segregation behaviors of end-to-end chromosome fusions.
- Table 1** Aneuploidy for Chromosomes 1, 4, and 22 in Binucleated (BN) and Mononucleated (MoN) HMECs at PD25 and PD36.
- Table 2** Last Division Aneuploidy: Nondisjunction Events of Selected Chromosomes in HMEC Binucleates (BN).
- Table 3** Last Division Aneuploidy: Distribution of Chromosomes 1 (Red), 4 (Blue), and 22 (Green) in Micronuclei (MN) of Binucleated (BN) HMECs.

Treball III

- Figure 1** Chromatin bridges in HMECs.
- Figure 2** Microtubule polymerization at plus MT ends during anaphase.
- Figure 3** Position of KT of bridged and non-bridged chromosomes in anaphase cells.
- Figure 4** KT-MT attachments in HMECs and Ptk1 cells.
- Figure 5** KT localization on chromatin bridges in HMECs and Ptk1 cells.

Treball IV

- Figure 1** Telomere-dependent polyploidization.
- Figure 2** Polyploid cells caused by incomplete cytokinesis.
- Figure 3** Enrichment of unstable chromosomes with long intervening chromatin in polyploid HMECs.
- Figure 4** Increased chromosome instability in polyploid HMECs.
- Supplemental Figure 1** Telomere-dependent polyploidization in 830 HMECs.
- Supplemental Table 1** Correlation of SFT (signal-free telomere) chromosomes per metaphase with tetraploidy levels at different PDs for two distinct donors.
- Supplemental Table 2** Analysis of the number of nuclei per cytoplasm in polyploid cells throughout the cell culture.

Discussió

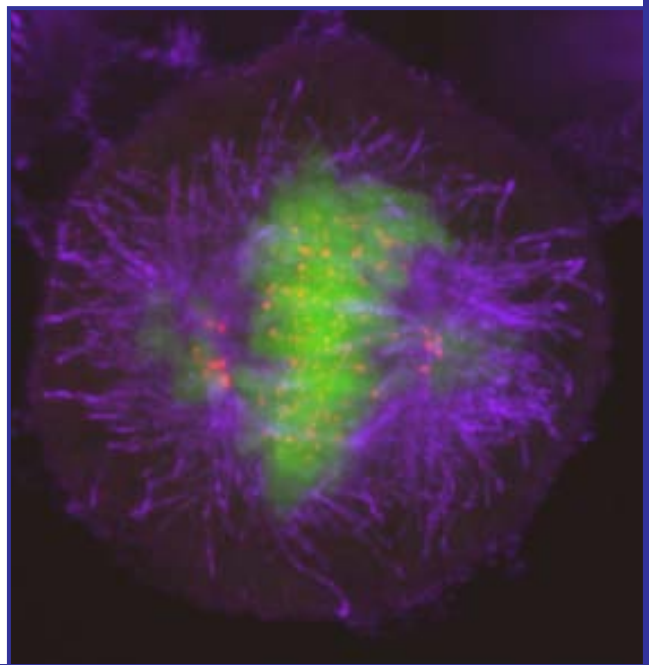
Figura 1 Recapitulació de les mesures de S-CIN degudes a disfunció telomèrica en HMECs tractades amb un inhibidor de la citocinesi (BN-HMECs).

Figura 2 Patrons d'hibridació observats quan es combina el CBMN amb l'ús de sondes pan-centromèriques o específiques de la zona centromèrica d'un cromosoma concret.

Figura 3 No-disjunció en HMECs.

Figura 4 Possibles destins dels ponts anafàsics.

Glossari



ALT: elongació telomèrica alternativa (de l'anglès *Alternative Lengthening Telomeres*)

ANM: morfologies nuclears anòmales (de l'anglès *Abnormal Nuclear Morphologies*)

APC/C: de l'anglès *Anaphase Promoting Complex* o *Cyclosome*

ATM: de l'anglès *Ataxia telangiectasia mutated*

AU: unitats arbitràries (de l'anglès *Arbitrary Units*)

B: protuberància nuclear

BCL2: de l'anglès *B-cell lymphoma 2*

BCR: clúster punt d'interrupció (de l'anglès *Breakpoint Cluster Region*)

BCR-ABL: clúster punt d'interrupció regió Abelson

BFB: fusió-pont-trencament (de l'anglès *Breakage-fusion-bridge*)

BGS: de l'anglès *Boiled Goat Serum*

BLM: proteïna helicasa *Bloom*

BN-HMEC: cèl·lules epitelials mamàries humanes binucleades induïdes

Bp: parells de bases (de l'anglès *Base pairs*)

Bub: de l'anglès *Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog*

BubR1: de l'anglès *budding uninhibited by benzimidazoles related 1*

CBMN: de l'anglès *cytokinesis-block micronucleus*

CCD: de l'anglès *Charge Coupled Device*

CDKN2A: gen inhibidor de la cinasa dependent de ciclina 2A (de l'anglès *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*)

Cdc20: de l'anglès *cell-division cycle protein 20*

CENPE: proteïna centromèrica E (de l'anglès *Centromere Protein E*)

CEP: regió centromèrica (de l'anglès *Centromeric Region*)

CIN: inestabilitat cromosòmica (de l'anglès *Chromosomal Instability*)

CREST: antisèrum específic per cinetocors

Cy3: de l'anglès *cyanine*

DAPI: 4'6-diamidino-2-phenylindol

DNA: àcid desoxiribonucleic

DSB: trencament de doble cadena (de l'anglès *Double Strand Break*)

EB1: de l'anglès End Binding *protein-1*

EGTA: àcid tetraacètic del glicol d'etilè

ERCC1: de l'anglès escission repair *cross complementing group 1*

FISH: hibridació *in situ* fluorescent

FITC: de l'anglès *Fluorescein Isothiocyanate*

G1: de l'anglès *Gap1*

G2: de l'anglès *Gap2*

GFP: proteïna de fluorescència verda (de l'anglès *Green Fluorescent Protein*)

Her2/neu: gen que codifica pel factor de creixement epidermic humà

HMECs: cèl·lules epitelials mamàries humanes (de l'anglès *Human mammary Epithelial Cells*)

HPV: virus del papil·loma humà (de l'anglès *Human Papillomavirus*)

HR: recombinació homòloga (de l'anglès *Homologous Recombination*)

k-MT o k-fiber: microtúbul cinetocòric

KT: cinetocor (de l'anglès *Kinetochores*)

LOH: pèrdua d'heterozigocitat (de l'anglès *Loss of Heterozygosity*)

M-FISH: hibridació *in situ* fluorescent múltiple

Mad: de l'anglès *Mitotic Arrest-Deficient protein*

Mbp: mega parells de bases

MEF: fibroblasts embrionaris de ratolí (de l'anglès *Mouse Embryonic Fibroblasts*)

MEGM: de l'anglès *Mammary Epithelial Growth Media*

MMR: sistema de reparació d'aparellaments erronis (de l'anglès *mismatch repair*)

MRN: complex proteic format per MRE11-RAD50-NBS1

MIN: inestabilitat de microsatèl·lits (de l'anglès *Microsatellite Instability*)

MN: micronucli

MoN-HMEC: cèl·lules epitelials mamàries mononucleades

MT: microtúbul

MT-KT: microtúbul-cinetocor (de l'anglès *Microtubule-Kinetochores*)

MTOC: centre organitzador de microtúbuls (de l'anglès *Microtubule Organizing Center*)

MVA: de l'anglès *Mosaic Variegated Aneuploidy*

NHEJ: recombinació no homòloga (de l'anglès *Non-Homologous End Joining*)

NPB: pont nucleoplasmàtic (de l'anglès *Nucleoplasmatic bridge*)

NRT: translocacions no recíproques (de l'anglès *Non Reciprocal Translocation*)

PARP2: de l'anglès Poly [ADP-ribose] polymerase 2

PBS: de l'anglès *Phosphate Buffered Saline*

PBST: solució de PBS amb el compost Tritó-X

PCM: material pericentriolar (de l'anglès *Pericentriolar Material*)

PD: de l'anglès *Population Doubling*

PHEM: solució tampó

Pin1: de l'anglès *peptidyl-prolyl cis/trans isomerase*

Plk: de l'anglès *Polo like kinase*

PNA: de l'anglès *peptide nucleic acid*

POT1: de l'anglès *Protection of Telomeres 1*

pRb: proteïna del Retinoblastoma

PTEN: de l'anglès *phosphatase and tensin homolog*

Ptk1: de l'anglès *Potorous tridactylus kidney cells*

PUMA: de l'anglès *p53 upregulated modulator of apoptosis*

Q-FISH: hibridació *in situ* fluorescent quantitativa

RAP1: de l'anglès *Repressor-Activator Protein 1*

RB: gen que codifica per pRb

RNA: àcid ribonucleic

S-CIN: inestabilitat cromosòmica estructural (de l'anglès *Segmental Chromosome Instability*)

SAC: punt de control del fus mitòtic (de l'anglès *Spindle Assembly Checkpoint*)

SCF: fusió entre cromàtides germanes (de l'anglès *Sister Chromatid Fusion*)

SFT: Telòmer lliure de senyal d'hibridació (de l'anglès *Signal Free Telomere*)

ST: de l'anglès *supplemental table*

TANK: de l'anglès proteïna *tankyrase*

TERC: de l'anglès *Telomerase RNA Component*

TERT: de l'anglès *Telomerase Reverse Transcriptase*

TIN2: de l'anglès *TRF1-Interacting Protein*

TRF: de l'anglès *Telomere Restriction Fragment*

TRF1: de l'anglès *Telomere Repeat Binding factor 1*

TRF2: de l'anglès *Telomere Repeat Binding factor 2*

TP53: gen humà que codifica per la proteïna p53

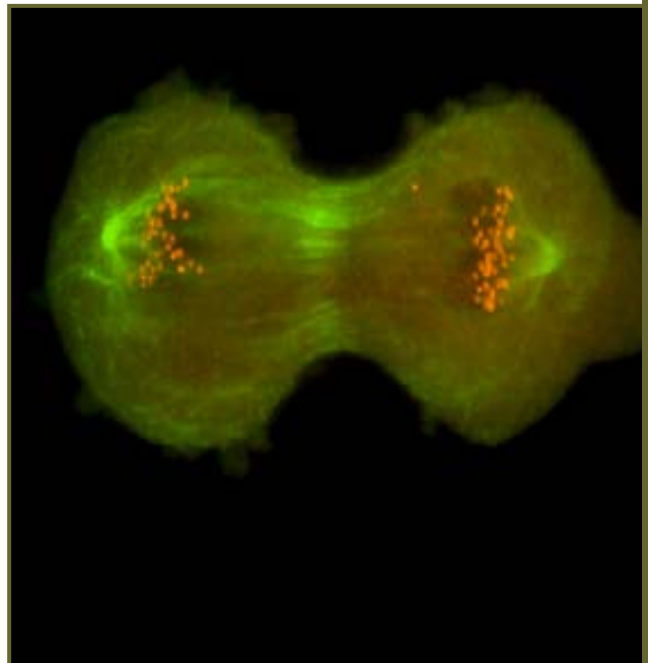
TPP1: de l'anglès *Tripeptidyl peptidase I*

TOFT: de l'anglès *Tissue Organization Field Theory*

W-CIN: inestabilitat cromosòmica numèrica (de l'anglès *Whole Chromosome Instability*)

WRN: proteïna helicasa *Werner*

Introducció



1.1 Què és el càncer?

El terme càncer s'utilitza per anomenar un conjunt de malalties caracteritzades per una proliferació cel·lular descontrolada que condueix a un increment net del nombre de cèl·lules en divisió. Existeixen molts tipus i subtipus de càncer, gairebé tants com tipus cel·lulars té l'organisme, els quals poden afectar diferents teixits o òrgans. La seva classificació es basa en una sèrie de regles senzilles que tenen en consideració el tipus cel·lular afectat i el lloc primari on s'ha desenvolupat el tumor (Kleinsmith, 2006). Així doncs, depenent del teixit d'origen, els càncers estan agrupats en tres categories:

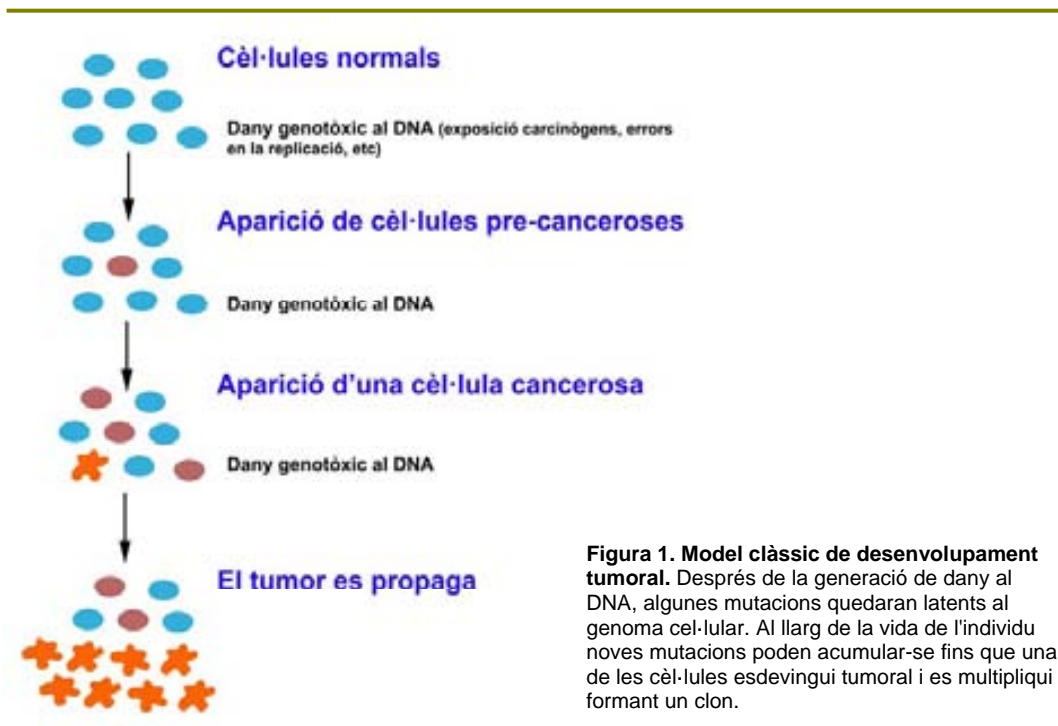
- **Carcinomes.** S'originen a partir dels epitelis que recobreixen les superfícies corporals internes i externes. Són el tipus de càncer més freqüent en la població humana adulta i representen un 90% de tots els càncers malignes. Els carcinomes que afecten al sistema digestiu, genital, mamari i respiratori són els més freqüents als Estats Units d'Amèrica (American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2009. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2009).
- **Sarcomes.** Es desenvolupen a partir de teixits de suport com els ossos, cartílags, vasos sanguinis, el teixit adipós, el conjuntiu i el múscul. Aquests tipus de tumors són força atípics i representen només un 1% del total dels càncers en humans.
- **Limfomes i Leucèmies.** Aquests càncers resulten de la desregulació de cèl·lules d'origen limfàtic i sanguini, respectivament. El terme limfoma es refereix a tumors que afecten principalment als ganglis limfàtics i a la melsa i que es desenvolupen principalment com a masses sòlides de teixit. En canvi, les leucèmies són càncers on les cèl·lules malignes proliferen principalment al torrent sanguini. Tot i ser infreqüents, la seva incidència pren especial rellevància durant la infantesa, on són el tipus tumoral majoritari (American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2009. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2009).

Per completar la seva denominació, la classificació anterior es complementa amb el tipus cel·lular concret a partir del qual s'ha originat el càncer. Prenent com a exemple els epitelis, aquests poden contenir cèl·lules glandulars, basals, escamoses, pigmentades o multipotencials. Així els carcinomes que se'n deriven s'anomenen adenocarcinoma, carcinoma de cèl·lules basals, carcinoma de cèl·lules escamoses, melanoma i teratocarcinoma, respectivament. Per últim, es fa referència al lloc primari on s'originen

(mama, pulmó, pròstata, etc). Així doncs, un càncer que es desenvolupa a la mama i està originat per una cèl·lula glandular se l'anomena adenocarcinoma de mama.

1.1.1 Teories sobre l'origen de les neoplàsies

S'han postulat diverses teories que intenten explicar l'origen de les neoplàsies. El **model clàssic** postula que la neoplàsia té un **origen mutacional**. És a dir, les cèl·lules al llarg de la vida de l'individu poden acumular mutacions en gens claus, les quals poden proporcionar-les-hi un avantatge proliferatiu (*revisat a Vogelstein and Kinzler, 2004*). Aquesta cèl·lula pre-cancerosa es propagarà formant un clon (**Figura 1**) (Greaves, 2002; Nowell, 1976). Mutacions addicionals aniran conferint més malignitat a les cèl·lules del teixit, fins permetre que algunes d'elles adquireixin la capacitat de penetrar al torrent sanguini i envair altres teixits, en un procés anomenat metàstasi. Segons aquest model, el desenvolupament del càncer comprèn **múltiples passos o barreres** (*multistep*) que les cèl·lules han de superar per esdevenir plenament malignes. D'acord amb aquest model s'ha observat, en anàlisis patològics, l'existència de graus de lesió diferents que correspondrien a passos intermedis de desenvolupament del càncer (Foulds, 1954). De manera equivalent, els models de cultiu *in vitro* mostren que les cèl·lules primàries normals han d'acumular determinades mutacions per adquirir característiques tumorals (Weinberg, 1989). Aquest model implica una **evolució clonal** en el desenvolupament del tumor; la cèl·lula que adquireixi major avantatge proliferatiu serà aquella que donarà lloc a les cèl·lules que formen el teixit tumoral. Les cèl·lules neoplàsiques a mesura que proliferen acumulen mutacions que els conferiran nous avantatges. Evidències actuals indiquen que la gestació del tumor necessita d'un **període de latència** per a què les cèl·lules adquireixin les mutacions necessàries per esdevenir tumorals. Aquest temps pot comprendre varies dècades tot i que pot veure's disminuït amb l'exposició a agents carcinogènics. Els fets que ho recolzen són l'augment de la incidència de càncer amb de l'edat i que l'exposició a agents carcinogènics s'associa a un escurçament del període de latència. Per exemple, estudis epidemiològics en supervivents de les bombes atòmiques de Hiroshima i Nagasaki mostren que es necessita un període de 3 a 5 anys per l'aparició de leucèmies, i d'uns 10 anys per l'aparició de tumors sòlids (*revisat a Lansdorp et al., 1996*).



En els últims anys s'ha determinat que, a més dels canvis genètics, les cèl·lules poden patir modificacions epigenètiques les quals podrien ser responsables de canvis en l'expressió de gens en la cèl·lula tumoral (Feinberg and Tycko, 2004). Tant el DNA com les proteïnes histones poden estar subjectes a modificacions epigenètiques. Les marques epigenètiques al DNA consisteixen en la presència de grups metil a les citosines que formen part de regions riques en dinucleòtids CpG, també conegudes com a illes CpG. El grau de metilació d'aquestes regions influeix sobre l'expressió del conjunt de gens que es troben sota el seu domini. Concretament, la hipermetilació de regions promotores s'associa a una manca d'expressió dels gens que governen, i *viceversa*. Les cèl·lules tumorals presenten alteracions en el patró de metilació del seu genoma. Els nivells generals de metilació en aquestes cèl·lules són inferiors en comparació amb les cèl·lules provinents de teixits adjacents no tumorals (Feinberg and Vogelstein, 1983). I no només això, sinó que aquest grau d'hipometilació incrementa paral·lelament amb el desenvolupament tumoral. Malgrat la hipometilació general de les cèl·lules neoplàsiques, aquestes presenten regions concretes del DNA amb un elevat grau de metilació. A les cèl·lules tumorals, les zones hipermetilades sovint corresponen a promotors de gens supressors de tumors. Per exemple, la hipermetilació dels promotors que regulen els gens *RB* i *CDKN2A*, els quals participen en la via de senyalització de pRb/p16^{INK4A}, s'ha

descriu en diversos tipus tumorals (Greger et al., 1989; Merlo et al., 1995; Radpour et al., 2010). L'altre element susceptible de ser modificat epigeneticament són les proteïnes histones. Les marques epigenètiques en aquestes proteïnes consisteixen en modificacions post-traduccionals d'aminoàcids concrets. Exemples de marques epigenètiques són l'acetilació de l'aminoàcid lisina, la metilació de l'arginina o lisina i forforilacions al residu serina (*revisat a Esteller, 2008*). Les marques epigenètiques sobre les histones els permet influir en processos cel·lulars com la replicació i reparació del DNA i també en l'expressió gènica. Modificacions d'histones errònies s'han observat en etapes inicials del desenvolupament tumoral i s'ha vist que el nombre d'errors augmenta significativament amb la progressió tumoral.

Degut a que el procés de desenvolupament tumoral és complex i no està totalment definit existeixen visions alternatives al model clàssic. A continuació es descriuen dues propostes alternatives en relació a l'evolució clonal del càncer: la primera fa referència al **tipus de cèl·lula fundadora del tumor** i la segona està relacionada amb el **moment de la metastasi**. En quant a la cèl·lula capaç de fundar el tumor, clàssicament s'havia proposat que qualsevol tipus cel·lular, després d'haver acumulat un conjunt de mutacions determinades, podia propagar-se i formar un clon. D'acord amb aquesta idea, s'havia observat que hi havia tants tumors com subtipus cel·lulars. Per contra, una nova visió proposa que només hi ha un subtipus cel·lular responsable de l'aparició del tumor: **les cèl·lules mare tumorals**. Recentment aquesta visió ha pres rellevància degut a evidències mostrades per cèl·lules de leucèmies agudes. En una mostra d'un pacient amb leucèmia mieloide aguda, es va demostrar que tan sols una fracció de les cèl·lules era capaç de transmetre la leucèmia a ratolins immunodeficients. Això suggeria que el creixement tumoral tan sols es devia a una petita fracció de cèl·lules: les cèl·lules mare tumorals (Bonnet and Dick, 1997) (**Figura 2**). De forma equivalent, també s'ha suggerit que una població de cèl·lules mare tumorals podria ser responsable de l'aparició de tumors sòlids (Ailles and Weissman, 2007; Phesse and Clarke, 2009). Els teixits epitelials estan formats per capes de cèl·lules les quals estan mantingudes per una població de cèl·lules mare adultes somàtiques amb potencial per formar tots els tipus de cèl·lules diferents que formen l'epiteli (Phesse and Clarke, 2009). Donat que aquestes cèl·lules presenten una capacitat innata per autorenovar-se i es troben especialment ben vascularitzades (Scadden, 2006), s'ha hipotetitzat que aquesta subpoblació proporcionaria cèl·lules a la massa tumoral en creixement (**Figura 2**). D'acord amb aquest model, s'han detectat marcadors de cèl·lules mare en diferents tumors sòlids (Iwasaki and

Suda, 2009). Malgrat aquests resultats, no s'ha provat que durant la carcinogènesi les cèl·lules mare tumorals resultin de la desregulació de cèl·lules mare normals, o per contra, siguin producte d'una desdiferenciació de cèl·lules ja madures.

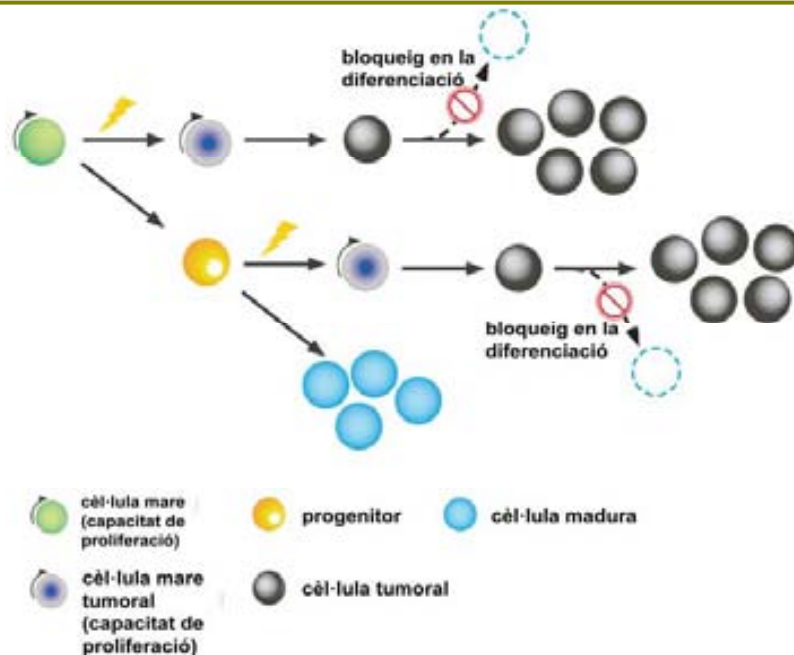


Figura 2. Les cèl·lules mare tumorals en el desenvolupament del càncer. Per la renovació dels teixits existeix un tipus cel·lular multipotent, les cèl·lules mare adultes. Aquestes proliferen per autorenovar-se, però també són font de cèl·lules progenitores, les quals no proliferen sinó que maduren per formar un subtipus cel·lular determinat. Pertorbacions en la cèl·lula mare adulta del teixit poden acumular-se fins que esdevé una cèl·lula mare tumoral. Aquesta proliferarà generant cèl·lules canceroses, les quals presenten un grau de diferenciació major que les cèl·lules progenitores. Tot i així, no són plenament madures i encara presenten alguns trets de cèl·lula mare, els quals permeten a la cèl·lula cancerosa proliferar més agressivament. (Modificat de Iwasaki and Suda, 2009).

Una visió alternativa a l'evolució clonal del càncer fa referència al moment de metàstasi. El **model clàssic** proposa que la metàstasi és l'últim pas en el desenvolupament tumoral. Les cèl·lules neoplàsiques que han acumulat determinades mutacions amb el temps, són capaces de penetrar al torrent sanguini i establir-se en altres teixits. Alternativament, s'ha suggerit un **model d'evolució paral·lela** (Gray, 2003) on una petita proporció de cèl·lules escaparien de la localització primària del tumor ja en un moment inicial i evolucionen a la nova localització independentment del tumor primari. D'acord amb aquesta idea, un estudi recent ha mostrat que cèl·lules epitelials mamàries normals de ratolí injectades intravenosament són capaces de sobreviure i establir-se en punts distants, on poden originar tumors (Podsypanina et al., 2008). Així doncs, és possible que les cèl·lules

puguin penetrar al torrent circulatori des de l'inici del desenvolupament tumoral, sobreviure i establir-se en un punt distant on fundarien un altre tumor. Donat que en aquest procés també actuaria una forta pressió selectiva, la metàstasi no es faria evident de forma immediata (Baudot et al., 2009). Degut a la complexitat dels mecanismes que condueixen al desenvolupament tumoral no es pot descartar que el model d'evolució paral·lela pugui coexistir amb el model clàssic.

Una visió més novedosa és la que proposen Sonnenschein i Soto (Sonnenschein and Soto, 2008). Típicament, en l'estudi del desenvolupament del càncer s'ha parat especial atenció a la cèl·lula, sense tenir massa en consideració que aquesta es troba inclosa dins un teixit. Els teixits, a més de cèl·lules epitelials, presenten altres components tant cel·lulars com de suport. Tenint en consideració l'organització específica de cada teixit, ha emergit una teoria anomenada **TOFT** (de l'anglès *Tissue organization field theory*) on es postula que el càncer és conseqüència d'un ambient tissular advers (*revisat a* Sonnenschein and Soto, 2008). Una alteració en l'estroma del teixit causaria la desregulació de les cèl·lules epitelials que conté per a que esdevinguin tumorals. Durant l'última dècada han aparegut evidències que donen suport a aquesta teoria. Per exemple, un estudi mostrà que l'estroma de la glàndula mamària de rates madures impedia el desenvolupament tumoral de cèl·lules cancerígenes epitelials en ratolí quan aquestes eren injectades subcutàniament (Maffini et al., 2005). Per contra, quan cèl·lules epitelials mamàries no-transformades eren trasplantades en un estroma que havia estat prèviament irradiat s'observà un increment en la incidència de tumors, mentre que els estromes no irradiats no mostraren lesions neoplàsiques (Barcellos-Hoff and Ravani, 2000). En conjunt, aquests estudis suggereixen, que el fenotip tumoral és adaptable a l'organització del teixit i que el "microambient" tissular controla la carcinogènesi epitelial.

1.1.2 Característiques de les cèl·lules tumorals

Tot i que l'adquisició de mutacions d'una forma més o menys atzarosa pot afectar diverses vies de senyalització cel·lular, s'ha descrit que els diferents tipus de tumors presenten unes característiques fisiològiques comunes (*revisat a* Hanahan and Weinberg, 2000):

- **Autosuficiència:** Les cèl·lules normals requereixen de factors de creixement per sortir d'un estat quiescent i començar a proliferar. De fet, cap cèl·lula podria proliferar sense la

presència d'aquests senyals estimuladors. Aquesta dependència envers als factors de creixement es fa evident quan les cèl·lules es cultiven *in vitro*. Aquestes únicament es poden propagar en presència d'un medi de cultiu que contingui aquests factors. Aquests senyals són transmesos a l'interior de la cèl·lula via receptors transmembranals i, a partir d'aquest punt, activen diverses vies de senyalització, que en última instància afecten l'expressió de gens relacionats amb la proliferació cel·lular. Les cèl·lules neoplàsiques poden desenvolupar diferents estratègies per disminuir aquesta dependència envers als factors de creixement i així poder proliferar en la seva absència.

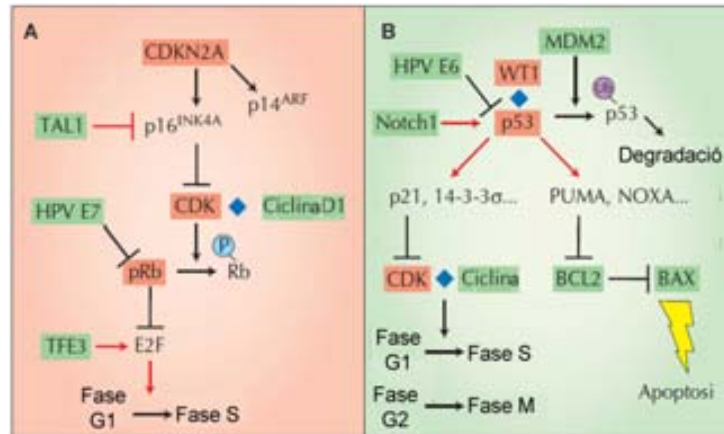
- **Insensibilitat als factors inhibidors del creixement:** El creixement de les cèl·lules també està regulat per factors antiproliferatius, que també transmeten els seus senyals via receptors transmembrana acoblats a circuits de senyalització intracel·lular. La cèl·lula presenta vies de senyalització que regulen el seu pas per les diferents fases del cicle cel·lular (**Caixa 1**). L'alteració d'aquestes vies és freqüent en molts tipus tumorals i confereix a les cèl·lules una capacitat de proliferació descontrolada.

- **Evasió de l'apoptosi:** La capacitat de creixement net del tumor no està només determinada per una taxa de proliferació cel·lular incrementada. La manca de resposta apoptòtica també pot contribuir a un increment net de cèl·lules neoplàsiques, i conseqüentment a l'expansió del tumor primari. El procés de l'apoptosi inclou una sèrie de passos definits que, de forma programada, condueixen a la mort de la cèl·lula. Durant l'apoptosi es desencadena la pèrdua d'integritat de les membranes cel·lulars, l'alteració del citoesquelet, la compactació de la cromatina i la degradació del DNA. L'apoptosi constitueix una barrera envers el desenvolupament tumoral ja que s'encarrega d'eliminar cèl·lules anòmales. Per tant, la seva evasió es un esdeveniment clau per al desenvolupament del tumor. Prova d'aquest fet és que les cèl·lules tumorals sovint mostren alteracions en l'expressió de proteïnes i/o vies de senyalització que participen en aquest procés.

- **Potencial replicatiu il·limitat:** El terme potencial replicatiu es refereix al nombre de vegades que una cèl·lula es pot dividir o, de forma equivalent, al nombre de vegades que pot replicar el seu DNA. El fet que unes cèl·lules proliferin sense control no significa que puguin proliferar indefinidament. La capacitat de proliferació de la majoria de cèl·lules en mamífers depèn de la longitud telomèrica. Els telòmers són complexos nucleoproteics que protegeixen els extrems cromosòmics i la seva integritat depèn directament de la longitud de la seqüència telomèrica. Considerant que la longitud telomèrica en les cèl·lules somàtiques disminueix progressivament amb cada divisió cel·lular, si la proliferació fos il·limitada aquesta disminució acabaria afectant les seqüències de DNA

codificant que hi ha per sota els telòmers. Per evitar-ho, les cèl·lules somàtiques deixen de proliferar. En canvi, les cèl·lules tumorals es multipliquen de forma il·limitada perquè han reactivat l'enzim telomerasa, encarregat d'allargar els telòmers, o mecanismes alternatius d'allargament telomèric per recombinació (ALT, de l'anglès *alternative lengthening telomere*).

Caixa 1 | Vies de senyalització relacionades amb p53 i pRb



A) Via de pRb. El gen *CDKN2A* codifica dues proteïnes implicades en el cicle cel·lular: p16^{INK4a} i p14^{ARF}, però és p16^{INK4a} la que està directament implicada en la regulació de pRb. La proteïna p16^{INK4a} s'uneix i inhibeix proteïnes CDKs (cinases dependents de ciclins) de control del cicle cel·lular. Amb la inhibició del complex Ciclina D1-CDK, la proteïna pRb roman en el seu estat hipofosforilat retenint el factor de transcripció d'E2F. En aquest escenari, E2F no pot dur a terme la seva funció de factor de transcripció i, en conseqüència, es deixen de transcriure una sèrie de gens essencials per la transició G1-S fent que la cèl·lula no prossegueixi pel cicle cel·lular (Sherr, 1996). La proteïna vírica E7, relacionada amb el virus del papiloma humà (HPV), és capaç de capturar pRb, permeten així un creixement anòmal.

B) Via de p53. p53 intervé en el control del cicle cel·lular per mitjà de l'inhibidor p21. Diversos tipus d'estrès cel·lular, com el dany al DNA, causen l'activació de p53 i p21. Aquesta última inhibeix el complex CDK-Ciclina tant a la transició de G1 a S, com durant el pas de G2 a mitosi, impedit d'aquesta forma l'avenç pel cicle cel·lular. Alternativament p53 també participa en l'apoptosi a través de proteïnes efectores com PUMA o NOXA que inhibeixen la proteïna proapoptòtica BCL2, induint així la mort de la cèl·lula. Aquesta via també pot veure's desregulada per factors virals, com la proteïna E6 de HPV, la qual inhibeix directament p53. L'alteració de p53 és una característica que comparteixen un 50% dels tumors (Hollstein et al., 1991). (Modificat de Vogelstein and Kinzler, 2004)

- **Angiogènesi:** La progressió de tumors incipients requereix l'adquisició prèvia d'activitat angiogènica (Hanahan et al., 1996). En aquest sentit una xarxa de capil·lars insuficient impediria el creixement del tumor degut a que els nivells d'oxigen i nutrients proporcionats no serien suficients per nodrir les cèl·lules neoplàsiques. S'ha vist que les cèl·lules tumorals poden incrementar l'expressió de factors angiogènics, alhora que disminueixen

l'expressió de factors anti-angiogènics. D'aquesta manera, amb el creixement del tumor es desenvolupa una xarxa de vasos sanguinis que permet la supervivència de les cèl·lules neoplàsiques.

- **Invasió de teixits i metàstasi:** Aquest tret té relació amb les unions cèl·lula-cèl·lula i/o cèl·lula-matriu extracel·lular. En els teixits no tumorals, les cèl·lules es troben normalment unides entre elles mateixes i alhora ancorades a la matriu extracel·lular que les envolta. Quan aquestes interaccions es veuen pertorbades, les cèl·lules normals activen una via de senyalització que desencadena l'apoptosi. Per contra, les cèl·lules tumorals poden desvincular-se de la seva localització original sense desencadenar apoptosi i envair altres teixits. Per a que les cèl·lules adquireixin aquesta capacitat es necessita l'alteració de proteïnes involucrades en la unió cèl·lula-cèl·lula i/o cèl·lula matriu extracel·lular.

D'acord amb el model de progressió clonal del càncer, les característiques que presenten les cèl·lules malignes no s'adquireixen en un mateix moment del desenvolupament tumoral, sinó que ho fan gradualment. Generalment, el que primer es produeix són errors en la regulació de la **proliferació cel·lular** i l'**apoptosi**. De fet aquestes característiques poden aparèixer alhora coincidint amb la mutació d'un únic gen, ja que alguns productes gènics participen en diferents vies de senyalització. Posteriorment amb l'activació de mecanismes que regulen l'**homeòstasi telomèrica** s'adquireix la capacitat de proliferació il·limitada. En una etapa posterior l'**angiogènesis** permetrà l'arribada de nutrients i oxigen a les cèl·lules de la massa tumoral afavorint així el seu creixement i la seva capacitat de disseminació a altres teixits del voltant o **metàstasi**.

1.1.3 Els gens del càncer

Els processos neoplàsics s'han relacionat amb mutacions en diferents gens, els quals s'han classificat en tres categories segons la funció primària de les proteïnes que codifiquen: els **oncògens**, els **gens supressors de tumors** i els **gens d'estabilitat** o **guardians del genoma** o **genome caretakers** (revisat a Vogelstein and Kinzler, 2004). Les mutacions que afecten els **oncògens** causen una major expressió gènica i poden emergir a conseqüència de translocacions, amplificacions gèniques o mutacions puntuals. En qualsevol cas, la mutació causa una major expressió o activitat de la proteïna producte. Generalment mutacions en un dels dos al·lels d'aquest tipus de gens són suficients per a que la cèl·lula que els conté presenti un avantatge proliferatiu. Els **gens supressors de tumors** en canvi, actuen bloquejant el creixement cel·lular o bé participen

en la inducció de senescència o apoptosi. Les mutacions d'aquests gens relacionades amb processos neoplàsics impliquen una pèrdua de funció, ja sigui per deleció, inserció inactivadora o silenciament epigenètic de la seva expressió. Al contrari que els oncògens, els gens supressors de tumors necessiten la pèrdua dels dos al·lels per a que la cèl·lula presenti majors aptituds per perpetuar-se. Per últim, hi ha els anomenats **gens d'estabilitat**, els quals comparteixen algunes característiques amb els gens supressors de tumors. Aquests gens participen en la reparació del DNA o en el control de la segregació cromosòmica i la seva funció és mantenir l'estabilitat del genoma de la cèl·lula (*revisat a Vogelstein and Kinzler, 2004*). En aquest cas també és necessària la pèrdua dels dos al·lels per a que es desencadeni un increment en la taxa de mutació.

L'existència de **càncers de tipus hereditari** posa de manifest la importància de les mutacions en gens clau a l'hora d'augmentar el risc de càncer. Algunes mutacions que afecten a la línia germinal poden causar l'aparició de **síndromes** que predisposen al càncer o ser responsables de l'aparició de **càncers de tipus familiar**. Una llista detallada de les mutacions associades amb l'aparició de tumors hereditaris descrites fins l'actualitat es pot consultar a l'enllaç: http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/germline_mutation.shtml. Els estudis en individus portadors d'alteracions en un al·lel d'un gen supressor de tumors o d'estabilitat han determinat que aquests presenten un risc elevat de perdre l'al·lel no defectuós, un procés conegut com a pèrdua d'heterozigositat (LOH) (Knudson, 1971). Un motiu que explicaria aquest fet és que l'herència d'aquests gens alterats predisposi a una taxa més elevada d'acumulació de mutacions que la normal. Un exemple seria el gen de *TP53*, el defecte del qual causa la Síndrome de Li-Fraumeni. Els individus portadors de la mutació presenten una major probabilitat de patir una segona mutació espontània a l'al·lel salvatge. Tot plegat fa que aquests individus presentin un 90% de probabilitat de desenvolupar càncer (Li and Fraumeni, 1982). El fet que les mutacions en els gens del càncer predisposin a l'aparició de tumors reforça el model mutacional del càncer.

Malgrat tot, un 95% de neoplàsies no són hereditàries (Sonnenschein and Soto, 2008). Els **tumors de tipus esporàdic** poden emergir a conseqüència de l'exposició continuada a agents mutagènics o bé presentar una etiologia desconeguda. S'han descrit factors externs que augmenten remarcablement la predisposició a patir determinats tipus de càncers. En aquests casos, la seva aparició és conseqüència de l'exposició repetitiva a un agent específic, com l'exposició perllongada a la llum UV en el cas del càncer de pell o el tabaquisme associat al de pulmó. En aquesta categoria també s'inclouen les infeccions

cròniques causades per agents patògens, les quals també incrementen la predisposició a patir algun tipus de càncer. Per exemple, durant una infecció persistent causada pel bacteri *Helicobacter pylori* el sistema immunitari genera una sèrie de mediadors inflamatoris, entre els quals hi ha agents oxidants, els quals causen dany al DNA. Si el bacteri no és eliminat, aquesta inflamació esdevé crònica i pot derivar finalment en l'aparició d'un càncer gàstric (Ernst, 1999). Alternativament, les infeccions víriques poden participar directament en el desenvolupament del càncer degut a que modifiquen directament el genoma de cèl·lula hoste i activen oncògens. Un exemple, seria el virus del papiloma humà (*human papillomavirus* o HPV) el qual està associat amb l'aparició de càncer de cèrvix. La capacitat transformadora d'aquest virus té la base en dues oncoproteïnes que codifica: E6 i E7, les quals interfereixen amb les vies de p53 i pRb, respectivament (**Caixa 1**).

Malgrat els esforços que es duen a terme per conèixer els desencadenants de l'aparició dels tumors esporàdics, en la majoria dels casos no es coneix en detall quins són els gens alterats que han donat lloc a la neoplàsia. Tot i que es podria pensar que les mutacions que permeten l'aparició dels càncers hereditaris són les responsables de l'aparició esporàdica del mateix tipus de tumor, aquest fet no s'ha pogut determinar. Les mutacions responsables dels càncers hereditaris no sempre s'observen en tumors de tipus esporàdic. I no només això, sinó que els tumors de tipus esporàdic presenten un ventall de mutacions que afecten altres gens (Vogelstein and Kinzler, 2004). De fet, dels 20000-25000 gens del genoma humà (De Leo et al., 2001), es coneix que més de 800 presenten un paper en el càncer (<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/Geneliste.html>). Així doncs, un millor coneixement dels mecanismes que desencadenen el càncer requereix investigacions exhaustives.

Amb la finalitat de descobrir els gens que es troben majoritàriament implicats en aquesta malaltia es va engagar el projecte "Genoma del Càncer" (per una llista actualitzada d'aquests gens consultar el següent enllaç: <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/>). Resultats preliminars de la seqüenciació del genoma de cèl·lules tumorals estan determinant que no tots els defectes en gens del càncer es troben igualment representats en els diferents tipus de tumors. De fet, entre el ventall de gens implicats en les mutacions observades en els tumors analitzats només uns pocs gens es troben alterats de manera freqüent en els diferents tipus de tumors (*revisat a* Negrini et al., 2010). Aquests són gens

que estimulen el creixement, com *EGFR* i *RAS*, o que el regulen negativament, com *CDKN2A* i *PTEN* i el gen supressor de tumors *TP53*.

1.2 Inestabilitat Genòmica i Càncer

Els càncers poden presentar diversos graus de reorganització a nivell del genoma segons quin sigui el tipus cel·lular que l'origina. La major part de neoplàsies hematològiques i limfomes presenten cèl·lules amb un cariotip poc reorganitzat amb aberracions cromosòmiques recurrents. Un exemple concret el trobem en la leucèmia mieloide crònica la qual resulta d'una translocació, usualment recíproca, entre dos punts concrets dels cromosomes 9 i 22, donant lloc al conegut cromosoma Filadèlfia (Rowley, 1973). El producte molecular d'aquesta translocació és la fusió BCR-ABL que codifica una proteïna híbrida amb activitat tirosina cinasa incrementada, fet que resulta en una sobreproducció de glòbuls blancs (Konopka et al., 1985; Konopka and Witte, 1985). En canvi, la majoria de carcinomes presenten cariotips altament reorganitzats amb aberracions cromosòmiques complexes i continguts de DNA fortament aneuploides, els quals no són recurrents entre les cèl·lules del mateix tumor (Mitelman Database: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>). Aquest elevat nivell de reorganització genòmica no pot ser únicament explicat per una taxa basal de mutació, sinó que per tal de desenvolupar-lo es necessita l'actuació d'un mecanisme generador d'inestabilitat genòmica (Loeb, 1991; Loeb, 2001; Nowell, 1976).

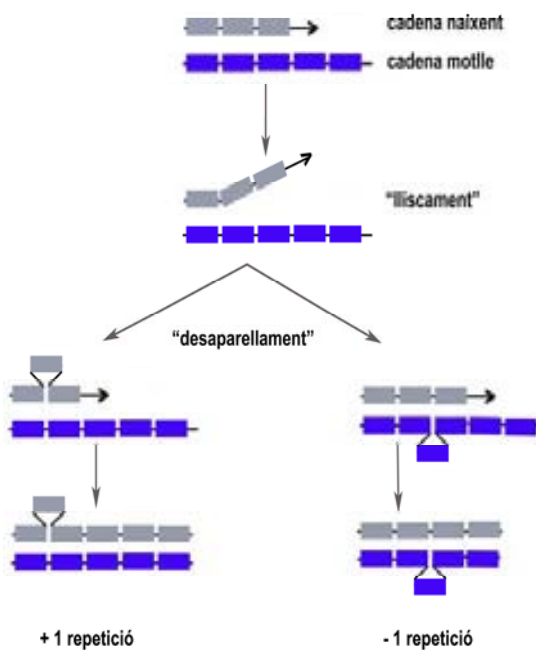
La inestabilitat genòmica pot definir-se com la contínua aparició d'alteracions a nivell de genoma, incloent mutacions, amplificacions, delecions o translocacions a mesura que les cèl·lules proliferen. La inestabilitat genòmica es refereix a una taxa i no a un estat cel·lular. Per tant, una població cel·lular pot presentar diferents intensitats d'inestabilitat genòmica, les quals poden ser constants o variar al llarg de les successives divisions. Aquesta contínua reorganització a nivell del genoma va ser primerament descrita en cèl·lules derivades de tumors colorectals (Lengauer et al., 1997). Aquests tumors presenten dos tipus d'inestabilitat genòmica clarament diferenciats: **la inestabilitat de microsatèl·lits** (MIN o *microsatellite instability*) i **la inestabilitat cromosòmica** (CIN o *chromosomal instability*) (**Caixa 2**). Però no només els càncers colorectals exhibeixen inestabilitat a nivell de genoma, sinó que la majoria dels carcinomes també presenten CIN en un moment o altre de seu desenvolupament. D'acord amb aquestes observacions es postula que la inestabilitat genòmica actuaria des dels estadis inicials del

desenvolupament tumoral i permetria l'acumulació de noves mutacions en cada cicle cel·lular. Mentre que unes quantes mutacions adquirides seran deletèries i desencadenaran l'apoptosi de les cèl·lules, altres mutacions podrien conferir un avantatge proliferatiu i/o de supervivència cel·lular promovent el desenvolupament del tumor. En aquest sentit el desenvolupament tumoral ocorre com si d'una selecció Darwiniana es tractés (Gatenby and Vincent, 2003; Greaves, 2002).

Caixa 2 | Inestabilitat en càncer colorectal

Inestabilitat de microsatèl·lits

(MIN): Aquest tipus d'inestabilitat genera fragments de DNA de diferents longituds per mitjà d'amplificacions o delecions que apareixen enmig de seqüències repetitives. La seva aparició està relacionada amb defectes en el sistema *mismatch* de reparació de dany al DNA, encara que també pot ésser promoguda per altres mecanismes encara no descrits. Les DNA polimerases quan repliquen seqüències repetitives tendeixen a l'error, degut a que "patinen" i es col·loquen en un punt anterior tornant a copiar la seqüència. D'aquesta manera una de les cadenes de DNA esdevé més llarga i el segment sobrant forma un llaç sobresortint, el qual és normalment escindit pel sistema de reparació *mismatch*. Amb l'alteració d'aquest sistema de reparació, l'escissió no té lloc i s'origina una divergència en la longitud de les seqüències de microsatèl·lits entre les cèl·lules (vegeu imatge dreta). Tot i que aquest tipus d'inestabilitat va ser primerament observada en càncer de colon de tipus hereditari, la MIN també afecta un 15% dels càncers colorectals esporàdics.



Inestabilitat Cromosòmica (CIN): La CIN es caracteritza pel continu guany o pèrdua de cromosomes sencers (CIN numèrica o **W-CIN, whole chromosome instability**) o fragments cromosòmics (CIN estructural o **S-CIN, segmental chromosome instability**) a mesura que les cèl·lules es divideixen. Aquest tipus d'inestabilitat emergeix durant la mitosi degut a segregacions anòmales del DNA entre cèl·lules filles emergents. Per definició, la CIN de tipus numèrica origina cèl·lules amb aneuploidies totals (afecten un/s cromosoma/es concret/s sencer/s), en canvi la CIN de tipus estructural genera noves reorganitzacions cromosòmiques i aneuploidies parcials (afecten fragments dels cromosomes).

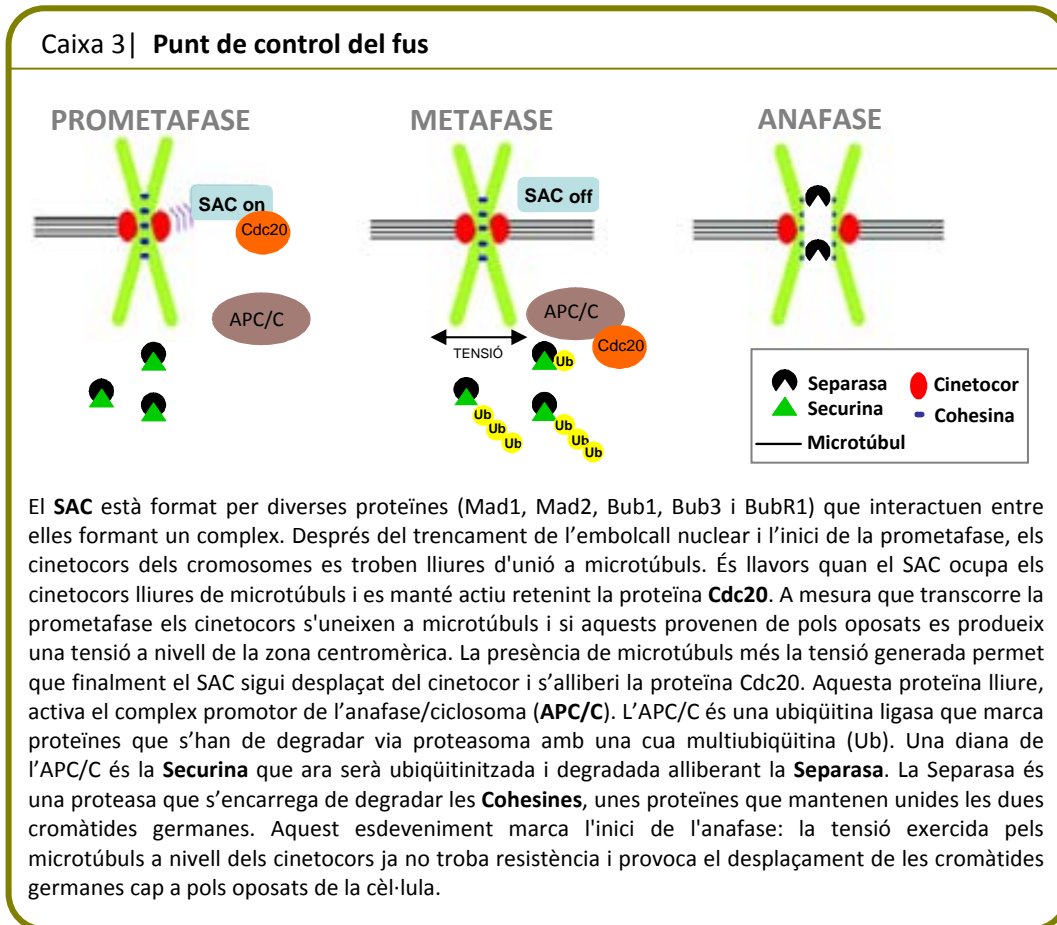
En essència, la inestabilitat genòmica està íntimament lligada amb la incapacitat de mantenir la integritat del genoma ja sigui durant la interfase, degut a una reparació errònia del DNA o, a causa de problemes en la segregació cromosòmica durant a la mitosi. Mentre que el terme MIN és un exemple concret d'un tipus d'inestabilitat que és causada per errors en el sistema de reparació MMR (de l'anglès *mismatch repair*), la CIN engloba diversos defectes generadors d'inestabilitat que resulten en problemes en la segregació dels cromosomes durant la mitosi. Degut a l'àmplia varietat d'errors que generen CIN, els aspectes més rellevants d'aquest tipus d'inestabilitat es detallen en els següents apartats.

1.2.1 Inestabilitat cromosòmica numèrica

Els mecanismes que desencadenen **CIN numèrica** o **W-CIN** promouen el continu guany o pèrdua de cromosomes sencers en cada divisió cel·lular. La base de la **CIN numèrica** es troba en errors en la migració dels cromosomes cap als pols del fus mitòtic, durant l'anafase. Abans de detallar els principals defectes que poden desencadenar CIN numèrica, cal destacar que els mecanismes generadors d'aneuploidia poden classificar-se en **no-disjunció** i **pèrdua anafàsica**, segons el destí final del cromosoma. Les **no-disjuncions** es produeixen quan les dues cromàtides d'un cromosoma sencer migren cap al mateix pol durant l'anafase. Com a resultat, una de les cèl·lules filles no rep cap còpia del cromosoma (monosomia) mentre que l'altra cèl·lula en rep les dues còpies (trisomia). En canvi, el terme **pèrdua anafàsica** descriu el fet que un cromosoma o cromàtide queda retardat en la seva migració cap als pols durant l'anafase, i acaba sent exclòs del nucli principal de la cèl·lula durant la telofase en forma de micronucli (MN). El destí final d'aquests micronuclis no està del tot establert, però típicament es postula que aquests acaben perdent-se en les successives divisions (Ford et al., 1988). No obstant, estudis més recents han permès determinar que els micronuclis poden ser degradats per la maquinària cel·lular d'una manera selectiva (Terradas et al., 2010). En qualsevol cas, la seva pèrdua origina cèl·lules monosòmiques o nul·lisòmiques, segons si el micronucli conté una o les dues còpies del mateix cromosoma, respectivament.

Existeixen tota una sèrie de mecanismes que vetllen per a que els cromosomes siguin segregats de manera correcta durant l'anafase. Primerament, els cromosomes han de quedar biorientats a la placa metafàsica, és a dir, cadascuna de les cromàtides germanes de cada cromosoma ha d'estar unida, pel cinetocor, a microtúbuls provinents del pol corresponent. Això permet que, durant l'anafase, cada cromàtide d'un mateix cromosoma

pugui ser dirigida cap als pols oposats de la cèl·lula i així, cadascuna de les cèl·lules filles rebi un joc cromosòmic complet. Per evitar errors en la segregació cromosòmica, les cèl·lules presenten un punt de control mitòtic anomenat **punt de control del fus** (*spindle assembly checkpoint* o SAC) (**Caixa 3**). Aquest mecanisme impedeix l'inici de l'anafase fins que tots els cromosomes es troben ancorats de forma correcta a microtúbuls provinents dels pols oposats del fus mitòtic. Normalment, la presència d'un sol cinetocor no ancorat a microtúbuls és suficient per evitar l'entrada a anafase (Li and Nicklas, 1995; Rieder et al., 1995; Rieder et al., 1994).



En la generació de W-CIN entren en escena diversos components directament relacionats amb l'establiment del fus mitòtic i la unió dels microtúbuls als cinetocors (MT-KT). Mentre que l'establiment del fus mitòtic està governat pels centrosomes, la correcta unió dels cinetocors als microtúbuls és verificat pel SAC. Defectes en qualsevol d'aquests dos

processos poden donar lloc a unions MT-KT anòmales que són font d'aneuploidia i W-CIN si no es corregeixen abans que s'iniciï l'anafase (**Figura 3**).

Durant la mitosi, després del trencament de l'embolcall nuclear els microtúbuls començaran a unir-se als cinetocors establint-se inicialment unions monotèliques i sintèliques. Degut a que cada cinetocor pot unir uns 20 microtúbuls (Maiato et al., 2004; Rieder, 1982), aquests també poden ser captats per microtúbuls provinents d'ambdós pols produint-se unions merotèliques. A mesura que la cèl·lula transcorre per metafase, les unions anòmales produïdes són reparades fins aconseguir que tots els cromosomes quedin biorientats (unió amfitèlica) i perfectament alineats a la placa metafàsica. Això permet que durant l'anafase es produeixi la correcta segregació d'ambdues cromàtides. Malauradament, l'eficiència d'aquest procés pot veure's perturbada per la presència de defectes en: el **SAC**, la **cohesió entre cromàtides germanes**, les **proteïnes implicades en la unió MT-KT**, o el **nombre de centrosomes**.

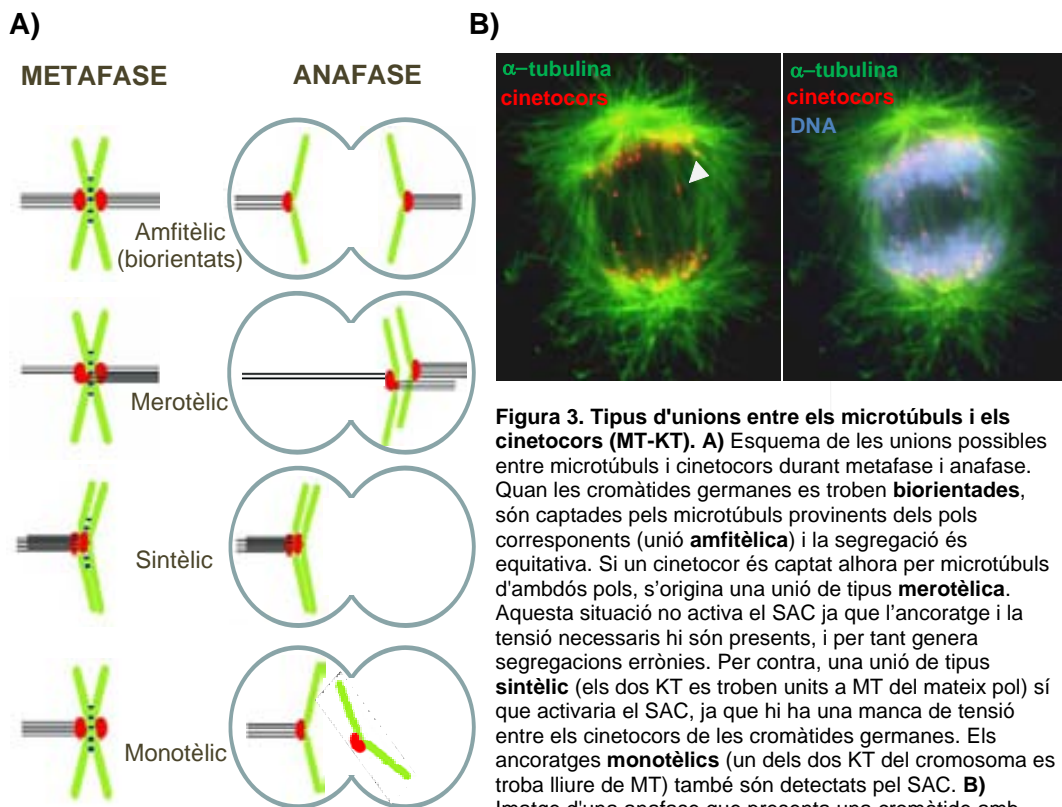


Figura 3. Tipus d'unions entre els microtúbuls i els cinetocors (MT-KT). **A)** Esquema de les unions possibles entre microtúbuls i cinetocors durant metafase i anafase. Quan les cromàtides germanes es troben **biorientades**, són captades pels microtúbuls provinents dels pols corresponents (unió **amfitèlica**) i la segregació és equitativa. Si un cinetocor és captat alhora per microtúbuls d'ambdós pols, s'origina una unió de tipus **merotèlica**. Aquesta situació no activa el SAC ja que l'ancoratge i la tensió necessaris hi són presents, i per tant genera segregacions errònies. Per contra, una unió de tipus **sintèlic** (els dos KT es troben units a MT del mateix pol) sí que activaria el SAC, ja que hi ha una manca de tensió entre els cinetocors de les cromàtides germanes. Els ancoratges **monotèlics** (un dels dos KT del cromosoma es troba lliure de MT) també són detectats pel SAC. **B)** Imatge d'una anafase que presenta una cromàtide amb una unió MT-KT de tipus merotèlic.

El defecte parcial de qualsevol de les **proteïnes implicades en el SAC** com ara Mad1, Mad2, Bub1 o BubR1 s'ha observat que desencadena W-CIN (Babu et al., 2003; Baker et al., 2004; Dai et al., 2004; Jelluma et al., 2008; Michel et al., 2001; Putkey et al., 2002; Weaver et al., 2003). Amb una disminució de proteïnes del SAC, la inactivació d'APC/C no pot ser sostinguda. En aquests casos, tot i la presència d'unions de tipus monotèlic, la cèl·lula entra en anafase i les cromàtides no unides acaben segregant-se erròniament (Weaver and Cleveland, 2005). D'aquesta forma la presència d'un SAC "dèbil" provoca la segregació errònia d'alguns cromosomes generant-se W-CIN de baixa intensitat, que a priori es compatible amb la viabilitat cel·lular. En canvi, el defecte total d'una de les proteïnes implicades en el SAC genera grans desajustaments en les dosis gèniques que comprometen la viabilitat cel·lular. Aquest fet queda reflectit a nivell del desenvolupament embrionari: els ratolins doble mutants per proteïnes del SAC no arriben a terme (Dobles et al., 2000; Kops et al., 2004; Meraldi et al., 2004a; Michel et al., 2004).

En relació a la **cohesió entre cromàtides germanes** s'ha observat que la sobreexpressió de la separasa o la securina produeix una separació prematura de les cromàtides germanes, fet que condueix a la generació d'aneuploidies (Yu et al., 2003; Zhang et al., 2008).

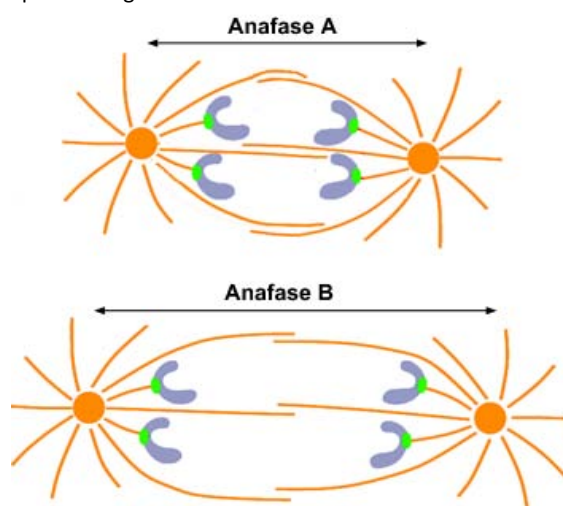
La desregulació de proteïnes que actuen a nivell **d'unió MT-KT** també és font de W-CIN. La inhibició de CENP-E, una proteïna localitzada al cinetocor i que es troba implicada en la captura dels microtúbuls, permet l'inici de l'anafase en presència d'unions monotèliques (Weaver et al., 2003). Un altre exemple el trobem en l'Aurora B, una proteïna que es troba implicada en la correcció d'ancoratges de tipus merotèlic mitjançant un augment en el recanvi de microtúbuls a nivell de KT (Cimini et al., 2006). Aquest fet promou la desunió dels microtúbuls que provenen del pol erroni fins que el cinetocor es ocupat només per microtúbuls provinents d'un únic pol. El defecte parcial en aquesta proteïna augmenta la presència d'ancoratges de tipus merotèlic i causa un increment d'aneuploidia (Cimini et al., 2006).

Un altre desencadenant de W-CIN està lligat al **nombre de centrosomes**. Els centrosomes són centres organitzadors de microtúbuls (MTOC) i el seu nombre no és constant al llarg del cicle cel·lular (**Caixa 4**).

Caixa 4 | Duplicació del centrosoma i el paper dels microtúbuls durant la mitosi

Les cèl·lules animals en interfase presenten un centrosoma format per dos centríols disposats de forma ortogonal més material pericentriolar (PCM). Quan la cèl·lula es prepara per dividir-se ha de replicar el DNA i duplicar el centrosoma amb la finalitat última de transmetre un set cromosòmic i un centrosoma a cada cèl·lula filla. Aquests dos processos íntimament relacionats es produeixen durant la fase S del cicle cel·lular, on es passa de cromosomes amb una cromàtide a dues cromàtides, i de dos a quatre centríols (revisat a Salisbury, 2007). Els centríols duplicats inicialment es troben agrupats formant un centrosoma i a mesura que la cèl·lula progressa cap a la mitosi se separen progressivament fins a posicionar-se en dos punts totalment oposats de la cèl·lula, establint els pols del fus.

Cada centrosoma projecta microtúbuls de forma radial, alguns dels quals contactaran amb el còrtex cel·lular (microtúbuls astrals), altres contactaran amb els cinetocors (microtúbuls cinetocòrics o *k-fibers*), i la resta contactaran amb microtúbuls provinents de l'altre centrosoma (microtúbuls solapats o polars). El lliscament antiparal·lel dels microtúbuls solapats és el que permet la separació dels centrosomes per establir-se en dos pols oposats. Per altra banda, els microtúbuls durant l'anafase intervenen en dos esdeveniments principals que succeeixen de forma solapada (vegeu imatge inferior): la segregació dels cromosomes degut a l'escurçament dels microtúbuls cinetocòrics, anafase A, i l'augment de la distància entre els dos pols, l'anafase B. Durant l'anafase A té lloc l'escurçament de les *k-fibers* per mitjà de la pèrdua de subunitats de tubulina a l'extrem que contacta amb el MTOC (extrem negatiu dels microtúbuls) més la pèrdua de subunitats a la interfície del cinetocor (extrem positiu dels microtúbuls). Tot plegat condueix a un escurçament de la *k-fiber*. En l'anafase B té lloc una addició de tubulina a l'extrem positiu dels microtúbuls solapats, juntament amb el seu lliscament antiparal·lel. Tot plegat permet augmentar encara més la distància entre els dos pols.



L'amplificació de centrosomes pot produir-se mitjançant set vies (Figura 4) (Fukasawa, 2002; Nigg, 2002; Sluder and Nordberg, 2004) i pot emergir de manera independent a la tetraploidització de la cèl·lula o bé aparèixer de forma concomitant:

- Un nombre extra de centrosomes pot aparèixer a conseqüència d'una sobre-duplicació dels centríols durant la fase S (Figura 4A). Defectes en els mecanismes encarregats de mantenir la cèl·lula aturada a la fase S del cicle cel·lular poden permetre que els centríols

es dupliquin més d'un cop. Per exemple, les cèl·lules d'ovari de hamster xinès tractades amb hidroxiurea -un inhibidor de la replicació del DNA-, poden sobreduplicar els centrosomes i generar un excés en el nombre d'aquestes estructures (Balczon et al., 1995). La sobreexpressió de Plk4, una proteïna implicada en la duplicació del centríol, permet una sobreduplicació d'aquests (Basto et al., 2008; Habedanck et al., 2005) i s'ha relacionat amb un increment en la incidència de tumors en ratolí (Basto et al., 2008; Ko et al., 2005).

- El material pericentriolar (PCM), que presenta capacitat per nuclear microtúbuls, pot originar centrosomes acentriolars. Aquest fet s'observa típicament després de la infecció del virus humà de cèl·lula T limfotrófic tipus 1 (Peloponese et al., 2005) (**Figura 4B**).

- Per altra banda, un nombre anòmal de centrosomes també pot ser degut a una separació no programada dels centríols que formen part del mateix centrosoma (**Figura 4C**). Normalment els centríols només se separen després de la seva duplicació (2 a 2), però s'ha observat que errors en el mecanisme que manté els centríols units genera una separació incontrolada d'aquests orgànuls, els quals poden establir mitosis multipolars (Forgues et al., 2003; Hut et al., 2003).

En tots aquests casos, l'amplificació de centrosomes apareix de manera independent a la tetraploidització. Per contra, en altres casos l'existència de centrosomes supernumeraris està acoblada a l'aparició d'una cèl·lula tetraploide.

- A conseqüència de la fusió de dues cèl·lules s'origina una cèl·lula amb el doble contingut de DNA i centrosomes (**Figura 4D**). Aquest fet, es pot observar després d'exposar les cèl·lules a raigs-X o a llum UV (Brathen et al., 2000; Kura et al., 1978).

- Alternativament, l'aparició de centrosomes extra juntament amb la tetraploïdia pot resultar de citocinesis avortades (**Figura 4E**). És a dir, cèl·lules que després de la telofase entren a G1 sense que s'hagi produït la citocinesi (Meraldi et al., 2002; Meraldi et al., 2004b; Sluder and Nordberg, 2004; Uetake and Sluder, 2004).

En aquests dos casos, la cèl·lula resultant conté dos nuclis diferenciats (cèl·lula binucleada).

- Però l'amplificació de centrosomes lligada a tetraploidització cel·lular també pot originar cèl·lules mononucleades. Per exemple, pel procés d'endoreduplicació la cèl·lula passa de G2 directament a G1 sense entrar en mitosi generant-se una cèl·lula tetraploide amb un

sol nucli (**Figura 4G**). Aquest procés pot produir-se quan la cèl·lula presenta dany al DNA capaç d'activar el punt de control de G2. Si el dany és persistent, la cèl·lula pot morir per apoptosi però, en ambients deficients per p53, la presència de dany no reparat desencadena l'endoreduplicació del DNA (Davoli et al., 2010).

- Per últim, la cèl·lula també pot "saltar" des de la metafase directament a G1, sense entrar en anafase, procés conegut com a *mitotic slippage* (**Figura 4F**). La capacitat de la cèl·lula per mantenir el SAC actiu en presència de cinetocors lliures de microtúbuls és limitada. D'acord amb això, quan ha transcorregut un cert temps i el SAC encara es troba actiu, la cèl·lula entra en G1 sense acabar la mitosi.

En aquests dos darrers casos, la cèl·lula tetraploide que n' emergeix presenta un sol nucli.

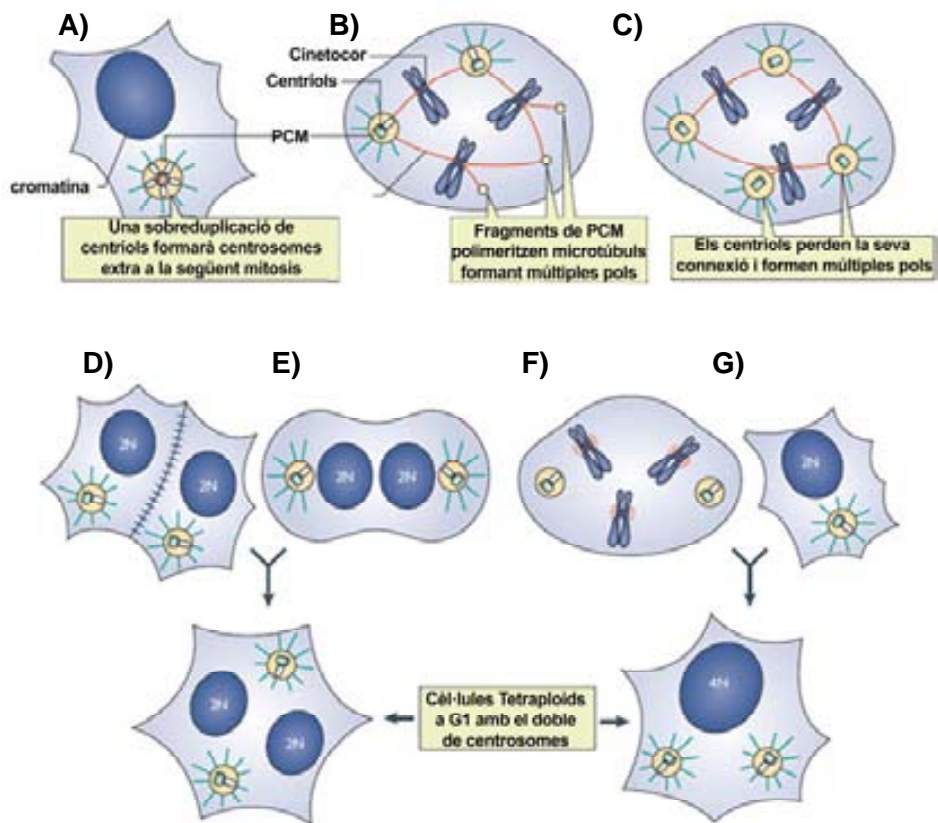


Figura 4. Vies d'amplificació centrosòmica. A) Sobreduplicació dels centríols. B) Fragmentació del material pericentriolar (PCM). C) Separació no programada dels centríols. (A, B i C no comporten duplicació del material genètic). D) Fusió de dues cèl·lules. E) Regressió de la citocinesi. F) *Mitotic slippage*. G) Processos d'endoreduplicació. D, E, F i G van lligades a l'aparició de cèl·lules tetraploides. (Modificat de Holland and Cleveland, 2009)

L'amplificació de centrosomes s'ha observat en biòpsies de tumors sòlids (Carroll et al., 1999; Ghadimi et al., 2000; Gisselsson et al., 2004; Gustafson et al., 2000; Lingle and Salisbury, 1999; Sato et al., 2001; Sato et al., 1999). A nivell funcional, un nombre de centrosomes extra pot resultar en mitosis multipolars amb més de dos grups de segregació cromosòmica, o en mitosis pseudobipolars, les quals mostren dos grups de segregació (**Figura 5**) (Gisselsson et al., 2004; Sluder and Nordberg, 2004). El que diferencia les mitosis bipolars de les mitosis pseudobipolars és el nombre de centrosomes present a cada pol. Mentre que les bipolars exhibeixen un centrosoma a cadascun dels dos pols, les pseudobipolars presenten més d'un centrosoma, almenys en un dels dos pols del fus.

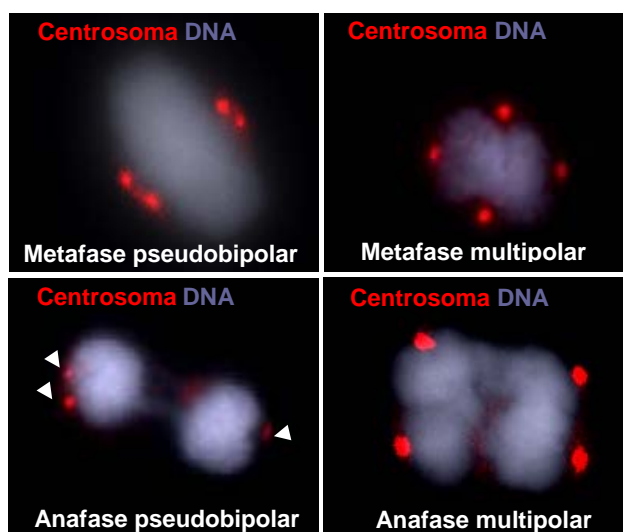


Figura 5. Imatges de configuracions mitòtiques degudes a amplifcació centrosòmica.

Els nivells d'aneuploïdia, que resulten de segregar els cromosomes a més de dos pols, en les cèl·lules filles són elevats i totalment a l'atzar (Gisselsson et al., 2008). Això resulta en la majoria de casos en una progènie altament aneuploide que és inviable (Ganem et al., 2009; Stewenius et al., 2005). Malgrat això, s'ha observat que cèl·lules de *Drosophila* i humanes poden proliferar normalment tot i presentar un nombre extra de centrosomes. Això indica que existeixen mecanismes o factors que minimitzen l'efecte deleteri de l'amplificació de centrosomes en cèl·lules proliferants (Brinkley, 2001). El seguiment amb tècniques de microscòpia a temps real de més de 200 fibroblasts procedents d'embrions de ratolí (MEFs) va demostrar que el 90% de les cèl·lules amb centrosomes

supernumeraris no es divideix fent mitosis multipolars (Sluder and Nordberg, 2004). En aquestes cèl·lules els centrosomes extra s'agrupen entre ells originant fusos pseudobipolars els quals són funcionalment bipolars però presenten més d'un centrosoma per pol. Aquest procés és conegut com a agrupament de centrosomes o *centrosome clustering* (Quintyne et al., 2005; Ring et al., 1982). La presència de centrosomes extra en cèl·lules humanes s'ha relacionat amb una activació persistent del SAC, fet que perllonga l'estada en metafase permetent el reagrupament de centrosomes en dos pols (Yang et al., 2008). Aparentment, aquesta situació seria ideal per a la viabilitat cel·lular ja que es recupera la situació normal de bipolaritat, però el cert és que aquest procés constitueix una font de W-CIN de baixa intensitat. La W-CIN pot emergir quan uns pocs cromosomes són capturats per dos centrosomes que en última instància formaran part de la mateixa cèl·lula filla (**Figura 6**) (Fukasawa, 2005).

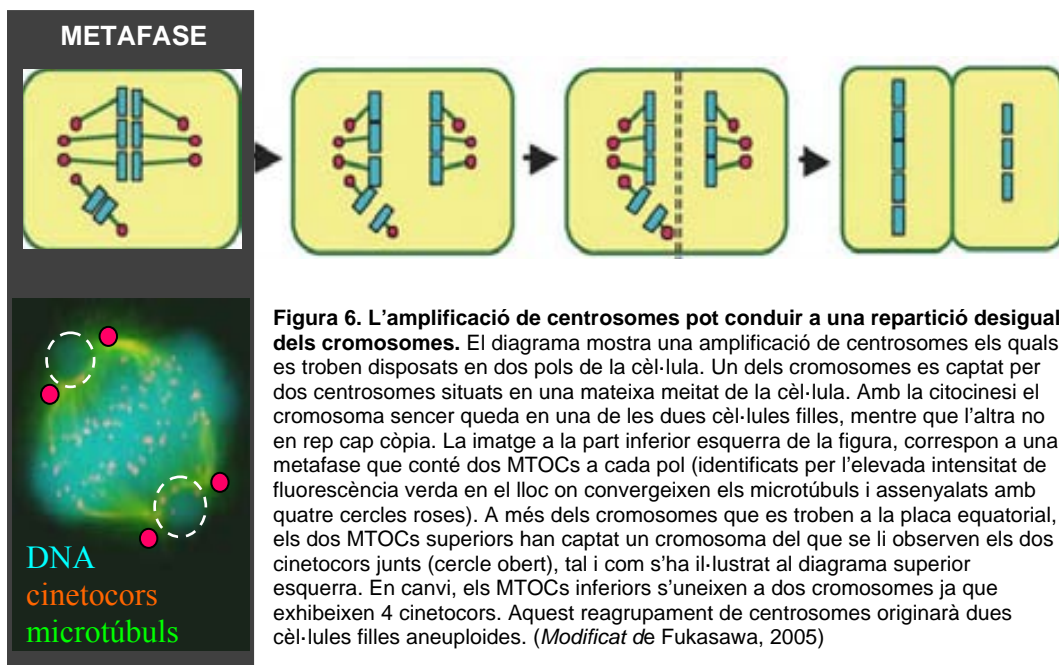


Figura 6. L'amplificació de centrosomes pot conduir a una repartició desigual dels cromosomes. El diagrama mostra una amplificació de centrosomes els quals es troben disposats en dos pols de la cèl·lula. Un dels cromosomes es captat per dos centrosomes situats en una mateixa meitat de la cèl·lula. Amb la citocinesi el cromosoma sencer queda en una de les dues cèl·lules filles, mentre que l'altra no en rep cap còpia. La imatge a la part inferior esquerra de la figura, correspon a una metafase que conté dos MTOCs a cada pol (identificats per l'elevada intensitat de fluorescència verda en el lloc on convergeixen els microtúbuls i assenyalats amb quatre cercles roses). A més dels cromosomes que es troben a la placa equatorial, els dos MTOCs superiors han captat un cromosoma del que se li observen els dos cinetocors junts (cercle obert), tal i com s'ha il·lustrat al diagrama superior esquerra. En canvi, els MTOCs inferiors s'uneixen a dos cromosomes ja que exhibeixen 4 cinetocors. Aquest reagrupament de centrosomes originarà dues cèl·lules filles aneuploides. (Modificat de Fukasawa, 2005)

A més, el procés d'agrupament de centrosomes supernumeraris en dos pols oposats també pot generar la segregació errònia d'uns pocs cromosomes degut a que s'afavoreixen els ancoratges merotètics (**Figura 7**) (Ganem et al., 2009; Silkworth et al., 2009). A la prometafase, la presència de més de dos centrosomes, afavoreix que un

mateix cinetocor quedi encarat a dos pols propers i pugui ser captat per microtúbuls provinents d'ambdós pols (**Figura 7A i B**). D'aquesta manera emergeixen ancoratges de tipus merotèlic. Aquests ancoratges poden resoldre's o persistir, segons com tingui lloc l'agrupament de centrosomes. Quan els centrosomes que participen en l'ancoratge merotèlic s'agrupen en un mateix pol l'ancoratge queda resolt. Si, per contra els centrosomes que intervien en l'ancoratge anòmal es posicionen en pols oposats l'ancoratge anòmal persisteix (**Figura 7B i C**).

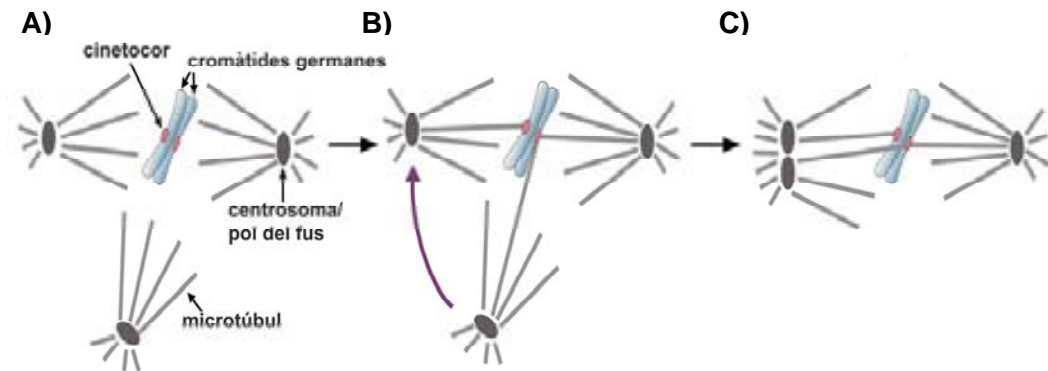


Figura 7. Els centrosomes es poden agrupar per formar fusos bipolars. Amb el trencament de la membrana nuclear, a prometafase, els cromosomes entren en contacte amb els microtúbuls del fus mitòtic. En presència de centrosomes en excés es molt probable que un cinetocor estigui encarat a dos pols alhora. Aleshores aquest cinetocor serà captat pels microtúbuls provinents d'aquests dos centrosomes generant un ancoratge de tipus merotèlic. Si la coalescència dels centrosomes té lloc tal com il·lustra la imatge, l'ancoratge merotèlic perdurarà en el transcurs de la mitosi generant CIN de tipus numèrica. (Modificat de Silkworth WT et al., 2009)

1.2.2 Inestabilitat cromosòmica estructural

El terme inestabilitat cromosòmica de tipus estructural, CIN estructural o S-CIN, es refereix al continu guany o pèrdua de segments cromosòmics al llarg de les successives divisions cel·lulars. La S-CIN s'origina principalment per problemes de segregació de reorganitzacions cromosòmiques inestables durant l'anafase. Els cromosomes reorganitzats amb dos o més centròmers per cromàtide poden ser estirats simultàniament cap a pols oposats durant l'anafase originant un pont de cromatina (pont anafàsic). El mateix pot passar quan les dues cromàtides d'un cromosoma en anell queden entrelaçades o fusionades a causa d'intercanvis entre elles, o quan es produeixen fenòmens de fusió de cromàtides germanes. Sigui quina sigui l'estructura cromosòmica aberrant, la seva aparició és conseqüència directa de dany al DNA i/o defectes en els mecanismes implicats en la seva reparació. De fet, existeixen diverses síndromes

genètiques degudes a mutacions en proteïnes relacionades amb la reparació del DNA caracteritzades per la presència d'instabilitat cromosòmica de tipus estructural. A continuació es detalla com es poden originar aquestes estructures i perquè són font d'instabilitat cromosòmica de tipus estructural.

Els cromosomes dicèntrics o en anell són el resultat de la reparació il·legítima de trencaments de doble cadena (*double strand breaks* o DSB). Normalment, la generació d'un únic DSB en un cromosoma d'una cèl·lula *per se* no desencadena CIN, ja que els dos fragments generats tenen una elevada probabilitat de reunir-se altra vegada restaurant el cromosoma original. En canvi, la generació de més de dos fragments cromosòmics pot resultar en la formació de reorganitzacions cromosòmiques donat que els mecanismes de NHEJ requereixen poca homologia entre els extrems per procedir a la reparació. Com a resultat d'una reparació errònia poden originar-se cromosomes reorganitzats susceptibles a desencadenar CIN estructural a partir de la seva entrada en el que es coneix com a cicles de fusió-pont-trencament (BFB o *breakage-fusion-bridge cycles*).

Els cicles BFB van ser descrits per primera vegada per la genetista Barbara McClintock l'any 1939, a partir de l'estudi de cèl·lules de *Zea Maize* irradiades amb raig X (McClintock, 1939). McClintock va observar que les cèl·lules irradiades presentaven ponts cromatínics que connectaven les dues masses de cromosomes acabats de segregat, tal i com il·lustra la **Figura 8**. Aquesta reconeguda genetista va postular que els ponts anafàsics es trencaven originant nous extrems recombinogènics, els quals podien ser reparats altra vegada donant lloc a noves configuracions cromosòmiques susceptibles de tornar a entrar al cicle.

No totes les reorganitzacions amb més de dos centròmers tenen la mateixa capacitat d'entrar en cicles BFB. Els dicèntrics intercromosòmics, formats per la fusió de dos cromosomes diferents, únicament poden generar S-CIN si es produeix una torsió en la regió intercentromèrica. Per contra, les cromàtides dicèntriques, formades per la fusió de les cromàtides germanes d'un mateix cromosoma (*sister chromatid fusion* o SCF) sempre formen ponts. Les figures en anell només formaran un pont a l'anafase si un nombre imparell d'intercanvis entrellaça les dues cromàtides germanes o un nombre parell les fusiona en un gran anell.

No només l'exposició de les cèl·lules a les radiacions ionitzants és font de DSB i desencadenant de CIN estructural al genoma de la cèl·lula. L'exposició a la llum UV, productes radiomimètics (per ex. bleomicina i neocarzinostatina) o inhibidors de la topoisomerasa I i II també poden produir DSBs. A nivell endogen, el metabolisme cel·lular també genera dany al DNA. Per exemple, els radicals lliures d'oxigen derivats de les rutes metabòliques causen lesions a les bases nitrogenades de la doble hèlix (Helleday et al., 2007; Povirk, 2006). El dany al DNA també pot aparèixer de forma "natural" a conseqüència de l'escurçament telomèric que presenten les cèl·lules proliferants. En aquest sentit, la pèrdua de l'estructura del llaç telomèric equival a la generació de DSBs (d'Adda di Fagagna et al., 2003) i a l'aparició de reorganitzacions cromosòmiques inestables (Karlseder et al., 1999; Smogorzewska and de Lange, 2002; Smogorzewska et al., 2002). Els mecanismes que donen lloc a disfunció telomèrica i les seves conseqüències s'expliquen amb més detall a l'apartat 3.3.

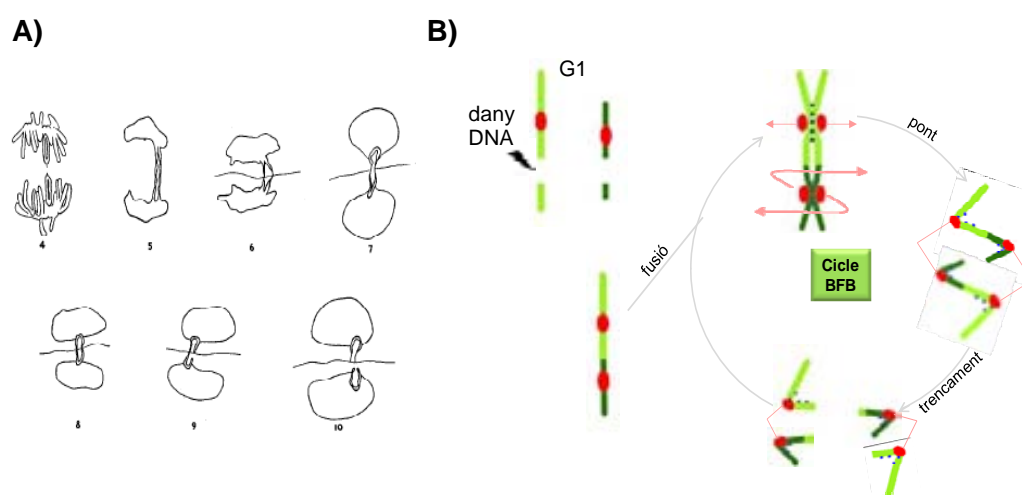
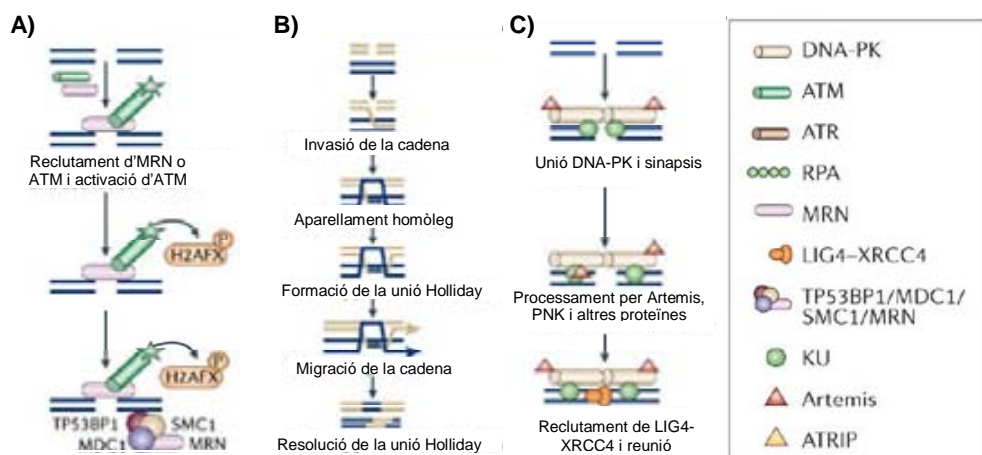


Figura 8. A) Il·lustracions dels cromosomes de cèl·lules irradiades de blat de moro en anafase i telofase. Els dibuixos representen diversos exemples de cèl·lules amb ponts de cromatina i el seu trencament (*modificat de McClintock, 1939*). **B) Cicles fusió-pont-trencament.** Les fusions entre dos cromosomes trencats a G1 poden ser reparats en forma de cromàtide dicèntrica. Amb la replicació s'origina un cromosoma dicèntric. Si aquest cromosoma en particular pateix una torsió al llarg de la seva regió intercentromèrica, aleshores els centròmers d'una mateixa cromàtide són dirigits cap a pols oposats del fus mitòtic originant un pont anafàsic. Amb el trencament del pont cromatínic es generen trencaments de doble cadena que poden ser reparats originant altres reorganitzacions cromosòmiques susceptibles d'entrar al cicle altra vegada, perpetuant la S-CIN.

Segui quina sigui la font del dany, el mecanisme general de reparació de DSBs és la **via de reunió no homòloga d'extremes** (NHEJ o *non homologous end joining*), però també pot actuar la **via de recombinació homòloga** (HR o *homologous recombination*)

(O'Driscoll and Jeggo, 2006) (vegeu **Caixa 5**). El sistema de HR bàsicament actua després de la replicació del DNA i durant la fase G2 del cicle cel·lular, i es caracteritza per reparar de manera fidedigne ja que utilitza una cadena motlle, generalment la de la cromàtide germana. L'inconvenient d'aquest mecanisme és que la seva acció és font de conversió gènica (Johnson and Jasin, 2000; Jonnalagadda et al., 2005), que podria afavorir la pèrdua d'heterozigositat (LOH) durant la carcinogènesi. En canvi, la via de NHEJ no té en compte cap seqüència homòloga per reparar. Per això, pot actuar en qualsevol fase del cicle cel·lular i permet una reparació més ràpida. Però aquesta via és una font d'errors per dos motius: 1) perquè pot unir extrems de manera il·legítima, i 2) perquè sovint els DSBs han de ser processats prèviament a la seva unió, cosa que introdueix deleccions i/o canvis nucleotídics al punt de trencament.

Caixa 5 | Detecció de DSBs i reparació per les vies de HR i NHEJ



A) Després de la detecció d'un trencament en ambdues cadenes de DNA s'activa ATM, una proteïna que presenta activitat cinasa pel que fosforilarà diversos substrats com la proteïna histona H2AX que, un cop fosforilada, s'anomena γ H2AX. La fosforilació d'aquesta histona s'estén més enllà del lloc del trencament, amplificant el senyal de dany i permetent el reclutament de les proteïnes de les vies de resposta al dany en el DNA. **B)** En la via de HR es genera un extrem sobresortint gràcies al complex MRN (Mre11, Rad50 i Nbs1). A la cadena senzilla generada s'hi uneix RPA. Seguidament es recluta una recombinasa (Rad51) la qual s'uneix a la cadena senzilla i ajuda a la invasió de la cromàtide germana (Helleday et al., 2007). **C)** En el sistema de reparació NHEJ un heterodímer de gran afinitat pels extrems de DNA, Ku70/80 embolcalla els extrems trencats. Seguidament es recluta la proteïna DNA-PKcs, la qual es manté unida als dos extrems trencats (Rivera-Calzada et al., 2005; Rivera-Calzada et al., 2007; Spagnolo et al., 2006). Finalment, aquesta proteïna regularà l'accés dels factors necessaris com la proteïna Artemis, les DNA polimerases (μ o λ) o el complex lligasa LIG4-XRCC4 per acabar de processar el dany i reunir els dos extrems trencats. (Modificat de O'Driscoll and Jeggo, 2006)

Si la mera presència de DSBs al DNA provoca l'aparició de cromosomes inestables degut a la seva reparació il·legítima, no és d'estranyar que mutacions en gens implicats en les diferents vies de reparació també puguin donar lloc a S-CIN. D'acord amb això, defectes en la via de NHEJ s'han relacionat en una major presència de ponts anafàsics (Acilan et al., 2007). De forma similar, defectes en proteïnes relacionades en la HR també s'han relacionat amb l'aparició de cromosomes de tipus inestable (Griffin, 2002; Griffin et al., 2000). Al següent enllaç es recullen exemples concrets de defectes en proteïnes implicades en la reparació de dany al DNA que causen l'aparició de CIN de tipus estructural: http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/germline_mutation.shtml. Cal destacar que moltes d'elles s'associen a determinades síndromes genètiques i a l'aparició de càncer.

En resum hi ha un ampli ventall d'agents endògens i exògens capaços de desencadenar CIN de tipus estructural, per mitjà de la generació de dany al DNA, la reparació il·legítima i la posterior entrada en cicles BFB. S'ha demostrat que la S-CIN generada mitjançant cicles BFB promou increments amb un factor de 10 en la taxa de mutació (Hackett JA, 2001). Tot plegat, indica que la S-CIN constitueix un potent mecanisme generador de defectes en gens supressors de tumors o gens guardians del genoma, que afavoreixen de forma activa el desenvolupament tumoral.

1.2.3 La inestabilitat cromosòmica i la seva avaluació

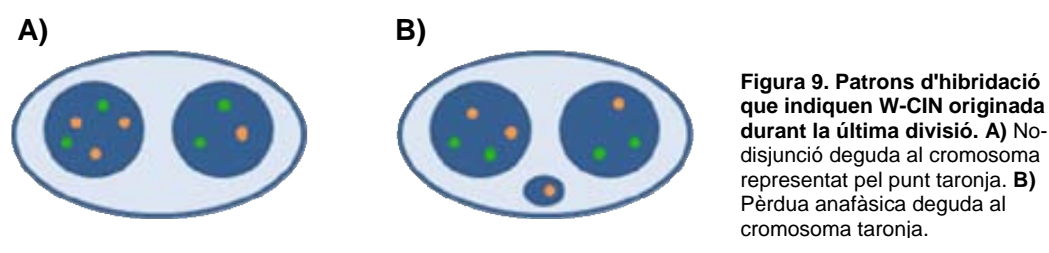
El terme inestabilitat cromosòmica fa referència a una taxa i no a un estat cel·lular concret (Lengauer et al., 1998). Per tant, la presència d'anomalies cromosòmiques estructurals i numèriques no és sinònim d'inestabilitat cromosòmica. Les cèl·lules dels pacients amb la Síndrome de Down presenten aneuploïdia –el guany o trisomia del cromosoma 21- però les seves cèl·lules no presenten inestabilitat cromosòmica (Antonarakis et al., 2004). Des que Nowell va proposar l'any 1976 que la inestabilitat genòmica és el desencadenant de la progressió tumoral, molts han estat els esforços per mesurar aquest esdeveniment (Nowell, 1976).

A inicis dels anys 70, la capacitat d'agents clastogènics i aneugènics de generar dany al DNA es mesurava *in vivo* mitjançant el recompte de micronuclis, **test de micronuclis**, en cèl·lules mononucleades (Heddle, 1973; Schmid, 1975). Els micronuclis (MNs) són estructures que típicament apareixen al citoplasma d'una cèl·lula després que cromosomes sencers o porcions d'ells quedin exclosos del nucli principal de la cèl·lula

durant la telofase. Tot i així, aquest assaig no és un mètode òptim per a mesurar la CIN, ja que els MNs poden ser degradats o exclosos de la cèl·lula en les successives divisions (Ford et al., 1988; Terradas et al., 2010). De fet, la taxa de divisió de les cèl·lules influeix molt en el recompte de micronuclis (Fenech, 2000). Aquest problema es va solventar quan es procedí a fer el recompte de MNs en cèl·lules on s'havia inhibit la citocinesi de forma artificial mitjançant l'ús de citocalasina B. Aquest assaig s'anomena **CBMN** (de l'anglès *cytokinesis-blocked micronucleus*) i va ser primerament desenvolupat per avaluar l'efecte de diferents agents mutagènics (Fenech and Morley, 1985). En l'assaig de **CBMN** el recompte de MNs es realitza en cèl·lules binucleades ja que després de l'anafase els nuclis germans queden inclosos dins d'un mateix citoplasma. La utilització del CBMN ha posat de manifest l'existència d'altres tipus de morfologies nuclears anòmales: els **ponts nucleoplasmàtics** (NPBs) i les **protuberàncies nuclears** (Bs). Els NPBs són ponts de cromatina que connecten els nuclis germans d'una cèl·lula binucleada. Aquestes estructures tenen el seu origen en els cromosomes dicèntrics o cromosomes en anell que han format un pont anafàsic. Mitjançant el CBMN els ponts anafàsics que desapareixerien amb la citocinesi, romanen íntegres a la cèl·lula binucleada (Thomas et al., 2003). Per tant, l'observació de NPBs és indicador de la presència de reorganitzacions cromosòmiques inestables en les cèl·lules. D'altra banda, les protuberàncies nuclears són una morfologia transitòria que forma part d'un procés pel qual les cèl·lules tumorals eliminen seqüències genòmiques amplificades (Shimizu et al., 1998). En aquest procés, les amplifacions serien extrusionades del nucli cel·lular durant la fase S per mitjà d'una protuberància, originant posteriorment un micronucli. El CBMN quan es combina amb altres tècniques, pot utilitzar-se per caracteritzar la CIN present a les cèl·lules.

L'assaig de CBMN s'ha validat com una metodologia adequada per a la valoració de S-CIN, quan s'utilitzen sondes locus específiques o de pintat cromosòmic, i de W-CIN quan es combina amb tècniques que permeten visualitzar els centròmers de tots els cromosomes. Les tècniques d'immunofluorescència amb anticossos contra proteïnes del cinetocor (Cimini et al., 1996; Eastmond and Pinkel, 1989), o d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH) utilitzant sondes pan-centromèriques (Camps et al., 2005; Cimini et al., 1996; Sgura et al., 1997) permeten avaluar la presència de cromosomes sencers – aneuploïdies- o fragments cromosòmics dins dels MNs, segons si aquests presenten o no senyal fluorescent, respectivament. Alternativament, aquesta metodologia també permet avaluar l'aneuploïdia generada per un o uns pocs cromosomes quan es combina amb sondes centromèriques específiques per a determinats cromosomes (Camps et al., 2005;

Chung et al., 2002; Hegarat et al., 2005) (**Figura 9**). En aquest cas, a part de poder detectar-se la presència del cromosoma determinat en el MN, també es pot valorar el seu guany o pèrdua en els nuclis germans de la cèl·lula binucleada. Aquest fet permet identificar si les aneuploïdies produïdes a la última divisió són per no-disjunció o per pèrdua anafàsica, segons el patró d'hibridació presentat pels nuclis germans de la cèl·lula binucleada (**Figura 9**). En el cas d'una no-disjunció un nucli germà presenta 3 senyals i l'altre 1, mentre que les pèrdues anafàsiques s'evidencien amb la presència d'un MN amb senyal centromèric, el qual manca en un dels nuclis principals.



La CIN també pot mesurar-se en nuclis interfàsics de cèl·lules no tractades (mononucleades). El 1997, Lengauer i col·laboradors van mesurar **W-CIN** en línies de càncer colorectal marcant el DNA α -satèl·lit corresponent a la zona centromèrica de dos cromosomes concrets i van avaluar la variació del nombre de senyals, nucli a nucli, entre les cèl·lules d'una mateixa colònia (Lengauer et al., 1997). Tot i així, la FISH amb sondes específiques sobre nuclis interfàsics de cèl·lules no tractades presenta una sèrie de limitacions: 1) no permet diferenciar la inestabilitat que ha tingut lloc durant la última divisió cel·lular, 2) en el cas de manca de senyal, no permet assegurar que aquest és realment una pèrdua cromosòmica o bé és un artefacte de la tècnica (per ex. solapament de senyals o errors en la hibridació), i 3) només permet avaluar la S- o W-CIN d'un nombre limitat de cromosomes.

Si interessa detectar anomalies (estructurals i/o numèriques) a nivell de tot el genoma cal fer una anàlisi de cromosomes metafàsics mitjançant el **cariotipatge** amb tècniques de bandeig convencional o bé aplicant hibridació *in situ* amb sondes de M-FISH. Les sondes M-FISH generen un patró d'hibridació diferencial per cada cromosoma. Aquesta informació posteriorment processada per un *software* especialitzat, assigna un color

específic a cadascun dels cromosomes de la cèl·lula. D'aquesta manera es detecten reorganitzacions cromosòmiques que podrien passar desapercebudes amb el cariotipatge tradicional. Per tant, l'anàlisi de cromosomes en metafase és una metodologia que permet obtenir valors acurats de CIN, a més de permetre discriminar quins són els cromosomes afectats. Tot i així, és una metodologia laboriosa ja que comporta una comparació exhaustiva entre cariotips per excloure anomalies cromosòmiques clonals. Finalment destacar alguns contrapunts de la tècnica: 1) les cèl·lules que després de presentar CIN aturen la seva proliferació queden excloses de l'anàlisi, de forma que s'infravaloren les taxes reals de CIN i 2) durant el procés d'obtenció de metafases poden introduir-se aneuploidies de manera artefactual.

1.3 Els camins que condueixen a la inestabilitat del genoma durant el procés de carcinogènesi

S'especula que és necessari que les cèl·lules acumulin entre 2 a 6 mutacions per a que es desencadeni un tumor esporàdic de tipus epitelial (Hahn et al., 1999; Kinzler and Vogelstein, 1996). Malgrat això, s'estima que cada cèl·lula acumula únicament un gen mutat en el transcurs de la vida d'un individu (Loeb, 2001). Això indica que en algun punt del desenvolupament tumoral sigui necessari la presència d'un mecanisme capaç de generar d'inestabilitat genòmica i l'aparició del tumor (Loeb, 2001). En humans l'anàlisi dels possibles mecanismes capaços d'incrementar la taxa de mutació es realitzen a partir d'estudis epidemiològics, cel·lulars i moleculars. S'han estudiat biòpsies de lesions pre-malignes i malignes i aquestes s'han comparant amb el teixit no tumoral que envolta a la lesió. L'estudi *in vitro* constitueix una altra font d'informació. Amb el cultiu de cèl·lules primàries i línies cel·lulars derivades de tumors es poden estudiar els mecanismes d'inestabilitat cromosòmica presents durant el desenvolupament tumoral. Altres indicis de com té lloc el desenvolupament de la neoplàsia deriven de l'anàlisi *in vivo* de models tan diversos com el llevat *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila* o animals rosegadors, entre d'altres. Tot i que les diferents teories sobre l'inici del càncer estan d'acord amb l'existència d'un mecanisme generador d'inestabilitat cromosòmica, molts dels estudis que s'han dut a terme separen la inestabilitat cromosòmica de tipus estructural de la numèrica, així com de la de ploïdia (anomalies en el nombre de dotacions cromosòmiques). En el següents paràgrafs es descriu la importància dels diferents tipus d'inestabilitat cromosòmica en la carcinogènesi.

1.3.1 Paper de l'aneuploïdia en el càncer

La presència d'aneuploïdies és una característica comú en els diferents tipus de tumors sòlids (Harrison et al., 1995; Mertens et al., 1997; Sandberg and Hossfeld, 1970; Watson, 1972). A més, se sap que tan el guany com la pèrdua de cromosomes sencers (**W-CIN**) és un fet usual en les cèl·lules derivades de tumors epitelials (Lengauer et al., 1998). Malgrat això, se segueix debatent si l'aneuploïdia és capaç de causar la CIN característica dels tumors o si únicament és una manifestació d'aquesta.

Duesberg i col·laboradors recolzen la idea que la inestabilitat genòmica de les cèl·lules tumorals podria aparèixer degut a aneuploïdia. L'estat aneuploide causaria desajustaments en milers de gens tot desencadenant una desestabilització del cariotip (Duesberg, 2000). D'acord amb aquesta teoria, s'ha vist que pacients amb la Síndrome de Down presenten una major predisposició a patir leucèmia limfoblàstica aguda (Satge et al., 2003). Malgrat això, aquesta associació no és tan senzilla, ja que els individus amb la Síndrome de Down presenten, per contra, una incidència de tumors sòlids menor que la resta de la població (Hasle et al., 2000; Satge et al., 2003). Així doncs, tot sembla indicar que, a més de l'aneuploïdia, altres factors són necessaris per iniciar una desestabilització del genoma. En aquesta línia, estudis on s'indueix transitòriament CIN numèrica en cultius *in vitro* de línies cel·lulars estables de càncer colorectal demostren que l'aneuploïdia, resultant d'ancoratges de tipus merotèlic, no desencadena la desestabilització del genoma (Thompson and Compton, 2008). A nivell d'altres organismes, com el llevat, s'ha vist que per adquirir un avantatge proliferatiu no és suficient amb l'aneuploïdia, sinó que es necessita un mecanisme generador d'hipermutabilitat (Li et al., 2009). Així doncs, tots aquests estudis suggereixen que es necessària l'entrada en escena d'altres factors encara no definits per generar una inestabilitat generalitzada i persistent capaç de desenvolupar un fenotip maligne a les cèl·lules.

Durant l'última dècada, estudis en ratolins modificats genèticament per diverses proteïnes del SAC ha posat de manifest una relació entre l'aneuploïdia i el desenvolupament tumoral. Tot i que, s'ha intentat establir una correlació entre els nivells d'aneuploïdia i la incidència de càncer (Ricke et al., 2008), la comparació directa entre estudis es veu dificultada per la gran complexitat del genoma i la variabilitat existent entre les diverses soques de ratolí utilitzades. Tot i així, aquests estudis mostren que el desenvolupament

tumoral en relació a l'aneuploïdia depèn de factors com el **context genètic** i el **nivell d'expressió** del gen modificat. En aquest sentit, a continuació s'exposen tres possibles escenaris en relació amb l'aparició de càncers que poden sorgir a conseqüència de la inducció d'aneuploïdia. La primera situació fa referència a com una mutació determinada produeix resultats divergents segons la soca de ratolí amb la que es treballa. Una doble mutació al gen *Bub1*, el qual codifica per un component del SAC que s'associa als cinetocors, causa letalitat embrionària en la soca de ratolí C57Bl/6J, mentre que en la soca 129P2/B6 els naixements arriben a terme amb les freqüències genotípiques esperades (Schliekelman et al., 2009). Aquests resultats indiquen que els rerefons genètic de les soques de ratolins utilitzades influeixen en els resultats. Una segona situació és dibuixa quan una mutació específica pot afavorir o suprimir el desenvolupament tumoral segons quin sigui l'òrgan primari que es trobi afectat. Els estudis fets en ratolins heterozigots pel gen que codifica per la proteïna cinetocòrica Cenp-E en són un exemple. Deficiències d'aquesta proteïna a nivell de cinetocors permet que la cèl·lula entri en anafase encara que restin cinetocors lliures d'unió a microtúbuls (Weaver et al., 2003). Doncs s'ha observat que els animals *Cenp-E*^{+/-} mostren una major predisposició a desenvolupar tumors espontanis de tipus pulmonar, mentre que la incidència de tumors hepàtics es inferior a la mostrada pels animals salvatges (Weaver et al., 2007). Aquests resultats demostren que l'aneuploïdia pot promoure la tumorigènesi depenent del conjunt de gens que s'expressa en un teixit determinat. I no únicament això, sinó que una proteïna determinada pot donar lloc a diferents incidències tumorals depenent del seu nivell d'expressió. Així, la generació de ratolins amb quatre nivells d'expressió de la proteïna Bub1 demostrà una correlació inversa entre el nivell d'expressió de Bub1 i el percentatge de tumors. La causa d'aquest fet recau en que Bub1, a més d'estar implicada en el SAC, també intervé en el procés cel·lular d'apoptosi. D'acord amb això, una menor expressió de Bub1 permet que les cèl·lules sobrevisquin en presència d'aneuploïdia generant un increment en la incidència de càncer (Jeganathan et al., 2007). Així doncs, a més dels rerefons genètic també s'ha de tenir en consideració que moltes de les proteïnes que intervenen en el punt de control del fus mitòtic també participen en altres processos cel·lulars que podrien ser claus en la generació del càncer.

Una altra coneguda font d'aneuploïdia és la presència d'anomalies en el nombre de centrosomes de les cèl·lules (Boveri, 1914), la qual podria desencadenar la inestabilitat genòmica necessària pel desenvolupament tumoral (Nigg, 2006). Diversos models de carcinogènesi en ratolí han demostrat que la sobreexpressió de determinats gens

conduïx a l'amplificació centrossòmica alhora que incrementa la incidència de tumors. Per exemple la sobreexpressió de Pin1, una proteïna que participa en vies de senyalització oncogèniques, causa l'aparició de centrosomes extra i un augment de tumors mamaris (Suizu et al., 2006). De manera similar, la sobreexpressió de l'oncogen *Her2/neu* també s'ha associat a l'amplificació de centrosomes i tumors mamaris en ratolí (Montagna et al., 2002). Però la demostració directa de que la presència de centrosomes supernumeraris causa tumors s'ha evidenciat recentment en un estudi en *Drosophila* (Basto et al., 2008), on es va observar que cèl·lules larvàries amb centrosomes extra eren capaces de produir metàstasis quan s'injectaven en l'abdomen d'animals hoste. Tot plegat subratlla que la W-CIN que es desencadena amb la presència de centrosomes extra pot contribuir activament en el desenvolupament tumoral.

Que l'aneuploidia *per se* no desencadeni CIN no significa que no tingui efectes a nivell d'expressió gènica que puguin modelar el desenvolupament tumoral. Diferents efectes s'han observat depenent de quin és el cromosoma aneuploide i/o quin és el nombre de còpies presents en la cèl·lula. D'entrada se sap que una cèl·lula té més probabilitats de sobreviure al guany d'un cromosoma que a una pèrdua. Prova d'aquest fet és que existeix un major nombre de síndromes humanes degudes a trisomies que a monosomies. En relació amb aquest fet es creu que la condició de monosomia sovint no permet assolir els nivells necessaris d'expressió proteica compatibles amb la viabilitat de les cèl·lules. A més, les monosomies permetrien l'expressió d'al·lels recessius que, en condicions de disomia serien emmascarats per l'al·lel salvatge restant. Tot plegat, sembla indicar que les pèrdues cromosòmiques no afavoririen la proliferació cel·lular, i per tant, obstaculitzarien el desenvolupament tumoral. En canvi, quan es produeix una trisomia, la presència del cromosoma extra fa incrementar en la cèl·lula el producte dels gens del cromosoma aneuploide (Williams et al., 2008). I no només això, sinó que segons la identitat del cromosoma trisòmic es pot afavorir la transformació cel·lular. En aquest sentit, s'ha observat que MEFs modificats per a que presentin una trisomia per un cromosoma concret, s'immortalitzen en diferents temps del cultiu depenent de la identitat del cromosoma extra. Així doncs, sembla que la predisposició a la transformació cel·lular vindria determinada per l'acció conjunta d'un grup concret de gens (Li et al., 2009; Williams et al., 2008).

Tot i que determinades mutacions en gens que codifiquen per proteïnes del SAC afavoreixen l'aparició de tumors en ratolí, aquestes són poc comunes en tumors humans.

Per una banda, només hi ha descrita una síndrome genètica relacionada amb CIN numèrica i càncer (MVA; OMIM 257300). Els individus afectes presenten una mutació en homozigosi en el gen que codifica per la proteïna BUBR1, una molècula clau per l'activació del SAC reclutada a nivell de cinetocors per CENPE, que els predisposa a una major incidència de càncers limfoproliferatius. A més, mutacions en proteïnes del SAC són poc freqüents en tumors sòlids (Cahill et al., 1998; Imai et al., 1999; Olesen et al., 2001; Schwartzman et al.). En resum, la conclusió que s'extreu dels treballs actuals és que tot i que és possible que determinades mutacions en gens del SAC que promouen l'aneuploïdia afavoreixin el desenvolupament tumoral, no en són un factor absolut ja que el rerefons genètic condiciona la progressió del tumor.

1.3.2 La importància de la poliploïdia en l'aparició de càncer

En humans, molts tumors sòlids presenten cèl·lules amb un perfil genòmic fortament aneuploide, amb continguts de DNA més propers a la tetraploïdia (hiperdiploides) que a la diploïdia (Storchova and Pellman, 2004). S'ha suggerit que aquests continguts hiperdiploides s'assoleixen després que, en estadis inicials del desenvolupament tumoral, aparegui una població tetraploide amb centrosomes extra que prolifera mitjançant divisions desiguals conduint a la una pèrdua progressiva de cromosomes. Aquesta consecució d'esdeveniments s'ha descrit en dos models humans de progressió tumoral: l'esòfag de Barrett i el càncer de cèrvix (Galipeau et al., 1996; Southern et al., 1997). Donat que, la presència de cèl·lules tetraploides s'ha observat en lesions pre-malignes de diferents tipus de càncers (Barrett et al., 2003; Galipeau et al., 1996; Maley, 2007), totes aquestes observacions apunten que l'aparició de cèl·lules tetraploides podria jugar un paper important en el desenvolupament de la neoplàsia.

En concordança amb l'existència d'un intermediari tetraploide durant la tumorigènesi, diversos estudis en ratolins modificats genèticament han mostrat que diferents defectes genètics poden donar lloc a una població cel·lular tetraploide i un increment en la incidència de càncer. Per exemple, ratolins que sobreexpressen la proteïna Mad2, que participa en el SAC, presenten un increment en la incidència de tumors (Sotillo et al., 2007). Quan s'examinà en major detall la ploïdia de les cèl·lules es va observar una subpoblació important de cèl·lules binucleades. Un segon exemple s'observa amb la sobreexpressió d'Aurora-A, una proteïna que participa en la separació dels centrosomes i en l'establiment del fus mitòtic. De manera equivalent a l'exemple de Mad2, la

sobreexpressió d'aquesta proteïna causa defectes en la citocinesi (Meraldi et al., 2002) alhora que eleva la incidència de tumors (Sotillo et al., 2007). A més, el defecte d'APC, un gen supressor de tumors relacionat amb l'aparició de càncer colorectal, cursa amb la binucleació espontània de les cèl·lules (Caldwell et al., 2007; Dikovskaya et al., 2007). Tot plegat subratlla que la poliploidització cel·lular és un procés que podria afavorir el desenvolupament tumoral. D'acord amb aquesta idea, estudis recents han demostrat que la inducció de tetraploidització a les cèl·lules juntament amb la desregulació del cicle cel·lular pot desencadenar la transformació cel·lular (Duelli et al., 2007). Però, la demostració directa de que les cèl·lules tetraploides promouen la carcinogènesi prové d'un estudi de cèl·lules epitelials mamàries procedents de ratolins heterozigots per p53 (Fujiwara et al., 2005). Aquests autors van comparar el potencial tumorigènic de cèl·lules diploides i tetraploides, aquestes últimes obtingudes experimentalment per mitjà del bloqueig artificial de la citocinesi. Els resultats demostraren que únicament la subpoblació tetraploide era capaç de transformar-se *in vitro* després de l'aplicació d'agents carcinogènics. Però el més important fou observar que, en absència de carcinogen, només aquestes cèl·lules tetraploides van ser capaces de formar tumors al ser injectades subcutàniament en ratolins immunodeprimits (Fujiwara et al., 2005). Un estudi similar, en el que la població tetraploide va ser generada per mitjà de la sobreexpressió d'Aurora B, va demostrar altra vegada aquesta capacitat tumorigènica específica de les cèl·lules tetraploides (Nguyen et al., 2009).

Durant l'última dècada s'ha obert un debat sobre la capacitat proliferativa de les cèl·lules tetraploides. Hi ha autors que recolzen l'existència d'un punt de control de tetraploidies depenent de p53, el qual impediria la seva proliferació aturant-les a G1 (Andreassen et al., 2001). Defectes en p53 silenciarien aquest punt de control permetent a les cèl·lules tetraploides proliferar amb un nombre extra de centrosomes. En un estudi posterior es va demostrar que aquest punt de control no existeix, i que l'eliminació de cèl·lules tetraploides a G1 seria deguda a altres factors (Uetake and Sluder, 2004). Malgrat que no hi ha un punt de control que comptabilitzi el nombre de cromosomes, diversos estudis han demostrat que els defectes en p53 afavoreixen de forma clara la proliferació de cèl·lules tetraploides (Fujiwara et al., 2005; Nguyen et al., 2009).

Globalment tot apunta a que les cèl·lules poliploides podrien jugar un paper important en el desenvolupament del càncer. En presentar com a mínim una doble dotació genètica, les mutacions deletèries en un al·lel podrien quedar emmascarades pels al·lells restants,

afavorint la supervivència de la cèl·lula. Per tant, aquestes cèl·lules serien bones candidates per sobreviure davant la forta selecció a la que estan sotmeses les cèl·lules que presenten inestabilitat cromosòmica durant el desenvolupament tumoral.

1.3.3 La importància de les reorganitzacions cromosòmiques en l'aparició del càncer

Des que es va desenvolupar la citogenètica convencional, i més endavant amb la citogenètica molecular, s'han anat identificant anomalies cromosòmiques estructurals, tant en tumors primaris com en línies tumorals. Aquestes anomalies poden ser translocacions (recíproques i no recíproques), delecions, amplificacions, duplicacions i inversions. Tal i com s'ha comentat anteriorment, les neoplàsies hematològiques poden presentar reorganitzacions cromosòmiques específiques (com la translocació entre els cromosomes 9 i 22 en la leucèmia mieloide crònica), que condueixen a l'activació d'oncògens. Estudis utilitzant models murins també han posat de manifest el potencial tumorigènic d'algunes reorganitzacions cromosòmiques. Per exemple, s'ha vist que ratolins doble deficientes per a p53 i proteïnes de la via de reparació no homòloga (NHEJ) acaben desenvolupant limfomes. Quan s'analitza en detall el cariotip d'aquests tumors s'observa que presenten una amplificació de l'oncogèn c-myc (Difilippantonio et al., 2002). Per una llista detallada de les reorganitzacions cromosòmiques específiques associades a l'aparició de càncers hematològics es pot consultar el següent enllaç: <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/Anomliste.html>.

La importància del manteniment del genoma per evitar la tumorigènesi també es posa de manifest amb l'existència de síndromes hereditàries degudes a defectes en gens d'estabilitat. Els individus afectats exhibeixen inestabilitat cromosòmica estructural a nivell cel·lular alhora que presenten una major incidència de patir tumors (per una llista detallada d'aquestes síndromes consultar Vogelstein & Kinzler, 2004).

A més, de les reorganitzacions cromosòmiques específiques relacionades amb tumors hematològics, la presència de cromosomes reorganitzats que condueixen a l'activació d'oncògens també s'han descrit en tumors sòlids. Una llista de reorganitzacions cromosòmiques que causen l'activació d'oncògens en tumors sòlids es pot consultar a l'enllaç: <http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/Tumorliste.html>. Tot plegat subratlla la importància

que tenen les reorganitzacions cromosòmiques a l'hora de generar nous productes gènics amb capacitat instigadora de la tumorigènesi.

1.3.4 La importància de la disfunció telomèrica en l'aparició de càncer

Tot i que les reorganitzacions cromosòmiques, l'aneuploidia i la poliploidia s'han associat amb l'aparició del càncer, cap dels factors que ho promouen mostren una clara relació amb l'envelliment. Per contra, l'aparició de carcinomes en la espècie humana augmenta exponencialment la seva incidència amb l'edat dels individus. Durant l'última dècada, diversos estudis han posat de manifest el paper de l'escurçament telomèric, i la seva relació amb la proliferació cel·lular i l'envelliment, en relació a l'aparició de carcinomes. En els següents subapartats es detalla el nexa entre la disfunció telomèrica i la carcinogènesi.

Els telòmers: estructura i funció

Les evidències de l'existència d'alguna estructura protectora als extrems dels cromosomes van ser aportades fa setanta anys pels treballs de Herman Müller (1938) i Barbara McClintok (1941), en observar que els extrems trencats dels cromosomes es fusionaven entre ells i mai ho feien amb els extrems cromosòmics naturals. D'aquí que es proposés que els extrems naturals dels cromosomes havien de presentar una estructura específica que els protegís de recombinacions il·legítimes, la qual va anomenar-se telòmer (del grec *telos*: final i *meros*: part). Però no va ser fins l'any 1978 quan Elisabeth Blackburn i Joseph Gall van determinar que els extrems dels cromosomes estaven constituïts per una seqüència de DNA específica, especialment rica en guanines en el protozou *Tetrahymena thermophila* (Blackburn and Gall, 1978). En humans, i en la resta de vertebrats, la seqüència telomèrica consisteix en repeticions en tàndem de sis nucleòtids TTAGGG que finalitza en un extrem 3' protuberant ric en guanines (Makarov et al., 1997). La longitud total de la seqüència telomèrica varia entre els vertebrats, per exemple la longitud dels telòmers en humans està al voltant de les 10-15 kilobases (kb) al moment del seu naixement, mentre que en ratolins i rates de laboratori la longitud és de 20-50 kb (de Lange et al., 1990; Hastie et al., 1990; Kipling and Cooke, 1990; Lejnine et al., 1995). El 1999, el grup de Titia de Lange va determinar que els telòmers funcionals de les cèl·lules de mamífer no són lineals, sinó que adquireixen una estructura en forma de llaç, anomenat *T-loop* o llaç-T, que segella cada extrem cromosòmic (Griffith et al., 1999).

Aquest llaç telomèric s'aconsegueix mitjançant el replegament enrere de l'extrem 3' protuberant, la seva posterior invasió de la regió telomèrica de doble cadena i el seu l'aparellament amb la cadena rica en citosines tot desplaçant la cadena rica en guanines (**Figura 10**). El manteniment d'aquesta estructura té lloc gràcies a les proteïnes TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, TPP1 i POT1, les quals formen un complex anomenat Shelterin (Palm and de Lange, 2008).

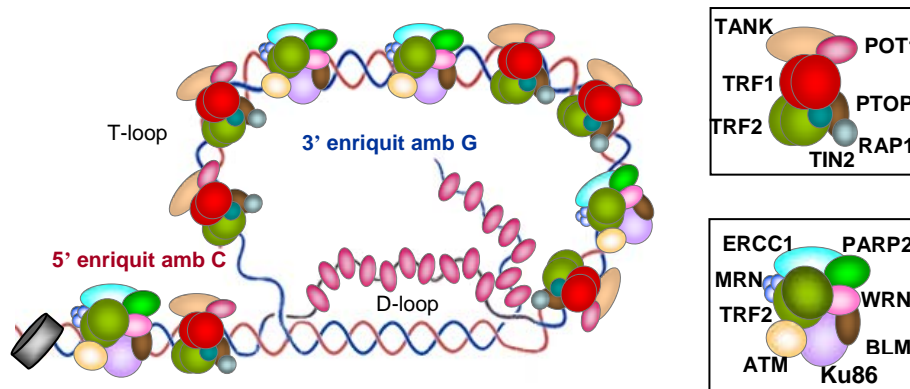


Figura 10. Representació d'un extrem telomèric. El complex *shelterin* engloba tres proteïnes d'unió a la seqüència telomèrica: TRF1, TRF2 i POT1, més tres proteïnes addicionals: TIN2, TPP1 i Rap1. Aquestes proteïnes poden associar-se formant els subcomplexes il·lustrats als quadres de la dreta. (Modificat de Genescà, et al., 2006)

Els components del complex Shelterin que s'associen directament a la seqüència telomèrica són TRF1, TRF2 i POT1, mentre que Rap1, TIN2 i TPP1 s'associen als primers (**Figura 10**). Aquest complex no només duu a terme una funció purament estructural, sinó que també regula la longitud del telòmer (de Lange, 2005). Tot i que TRF1 i TRF2 poden modular la longitud telomèrica (Kim et al., 2009; Smogorzewska et al., 2000; van Steensel and de Lange, 1997), és POT1 qui la regula d'una forma més directa. POT1 és l'únic component del complex que s'uneix a l'extrem sobresortint 3', el qual és el substrat de la telomerasa. La seva presència en determinades posicions de l'extrem protuberant impediria l'accés de la telomerasa, ja que el defecte en POT1 cursa amb una elongació dels telòmers (Lei et al., 2004; Lei et al., 2005; Loayza and De Lange, 2003; Ye et al., 2004). A més, s'ha observat *in vitro* que POT1 i l'enzim telomerasa "compeixen" per associar-se a l'extrem 3' (Kelleher et al., 2005; Lei et al., 2005). A la **Caixa 6** s'expliquen els mètodes més rellevants per a la mesura de la longitud telomèrica, així com els mètodes emprats per avaluar la disfunció telomèrica.

Caixa 6 | Tècniques per mesurar la longitud telomèrica i detectar la presència de telòmers disfuncionals

Existeixen diferents tècniques per avaluar la longitud telomèrica, les quals es poden classificar segons si permeten obtenir una mesura de la longitud telomèrica global en una població cel·lular o bé de forma específica a cada extrem cromosòmic. Una tècnica que cau dins la primera categoria és la del TRF *assay* (de l'anglès *Telomere Restriction Fragment Assay*). Aquesta tècnica consisteix en una digestió del DNA genòmic d'una població de cèl·lules amb enzims de restricció els quals digereixen tot el DNA cel·lular a excepció del telomèric i subteloemèric. Llavors, el DNA no digerit es fa córrer en un gel d'electroforesis i es revela mitjançant la tècnica de *southern* amb una sonda telomèrica marcada. Aquesta tècnica permet obtenir la mitjana de la longitud telomèrica de les cèl·lules d'una mostra (Bryant et al., 1997; Meeker et al., 2002), però no permet avaluar la longitud telomèrica de forma individual a cada extrem cromosòmic. Donat que no és el promig de la longitud telomèrica d'una cèl·lula el que dona lloc a disfunció telomèrica, sinó la presència d'extrems disfuncionals (Hemann et al., 2001; Latre et al., 2003), s'ha establert altres metodologies que es basen en la hibridació *in situ* amb sondes telomèriques. Una mesura precisa de la longitud dels telòmers a cada extrem cromosòmic pot obtenir-se per Q-FISH (de l'anglès *quantitative FISH*) utilitzant sondes PNA (de l'anglès *peptide nucleic acid*). Aquestes sondes contenen un esquelet sucre i fosfat de càrrega neutra, que no són repel·lides per la càrrega negativa del DNA, aconseguint així una major eficiència d'hibridació (Pellestor and Paulasova, 2004). Un *software* especialitzat permet quantificar les repeticions TTAGGG segons la intensitat del senyal que emeten, després de normalitzar els valors obtinguts amb mostres hibridades de plàsmids que contenen un nombre de repeticions telomèriques conegut. Tot i les avantatges de la Q-FISH, a vegades no interessa tant conèixer el nombre exacte de repeticions TTAGGG, sinó identificar de manera precisa quins són els cromosomes amb telòmers disfuncionals. Un mètode ràpid, senzill i eficient per fer-ho consisteix en valorar la presència o absència de senyal d'hibridació de sondes PNA-FISH als telòmers combinada amb l'anàlisi del cariotip. S'ha determinat que l'absència de senyal d'hibridació telomèric en un extrem cromosòmic és indicatiu de longitud telomèrica críticament erosionada, i per tant, molt probablement disfuncional. La funcionalitat del telòmer s'ha establert en 78 parells de bases, ja que és la longitud necessària per formar el *T-loop* (Capper et al., 2007). El límit de resolució de la sonda PNA emprada per a la detecció dels telòmers és 1000 parells de bases (Poon et al., 1999), per tant un extrem negatiu pot contenir un nombre suficient de parells de bases per formar el *T-loop*. Tot i així, s'ha demostrat que aquesta aproximació continua sent un indicador vàlid de disfunció telomèrica (Espejel et al., 2002; Soler et al., 2005).

L'enzim telomerasa, aïllat per primera vegada per Carol Greider i Elisabeth Blackburn el 1985, consisteix en dues subunitats: TERC que conté un RNA motlle per a la síntesis de la seqüència telomèrica i la subunitat catalítica o TERT, una transcriptasa inversa (Greider and Blackburn, 1987). L'activitat d'aquest enzim no és ubiqua, sinó que està limitada a alguns tipus cel·lulars, com ara cèl·lules germinals (Wright et al., 1996), cèl·lules mare hematopoiètiques, cèl·lules mare adultes (Chiu et al., 1996), i limfòcits activats (Maini et al., 1999; Martens et al., 2002; Norrback et al., 2001; Weng et al., 1997). Finalment destacar que aquest enzim també s'expressa en la majoria de les cèl·lules tumorals (Shay and Bacchetti, 1997).

La homeòstasi telomèrica és un esdeveniment poc estudiat i, en condicions normals, la telomerasa enlloc d'allargar tots els extrems per igual, es focalitza en la elongació de extrems críticament curts (Teixeira et al., 2004). Recentment s'ha vist que en cèl·lules canceroses la telomerasa és promiscua i escull de forma aleatòria els telòmers a elongar (Zhao et al., 2009). Això fa que sigui extremadament complicat relacionar els efectes de la disfunció telomèrica mitjançant l'ús de línies cel·lulars canceroses.

El paper dels telòmers: limitant el potencial replicatiu i promovent la senescència cel·lular

Al contrari que les cèl·lules germinals, les cèl·lules somàtiques de mamífers presenten mecanismes que impedeixen una proliferació il·limitada. L'any 1965 els treballs de Hayflick (Hayflick, 1965) en cultius cel·lulars *in vitro* van posar de manifest que els fibroblasts presenten un potencial replicatiu finit, podent-se dividir un nombre limitat de vegades. Estudis fets al llarg dels anys han mostrat que els cultius primaris de fibroblasts exhibeixen una primera fase de proliferació exponencial seguida per un *plateau*, en el que les cèl·lules deixen de dividir-se, entrant en una fase coneguda com a senescència replicativa (**Figura 11**). En aquesta fase de senescència, les cèl·lules, tot i mantenir-se vives i metabòlicament actives, deixen de proliferar.



Figura 11. Fases del cultiu *in vitro* de fibroblasts. La fase I correspon a l'inici del cultiu. A mesura que les cèl·lules proliferen s'entra en una fase de creixement exponencial (fase II de la corba). Passat un nombre limitat de divisions, les cèl·lules deixen de replicar-se i el cultiu entra en una fase de *plateau*, en la que les cèl·lules es troben en senescència replicativa. (Modificat de Shay and Wright 2000)

És l'escurçament telomèric progressiu el que determina l'aparició de la senescència replicativa (Bodnar et al., 1998; Harley et al., 1990; Kim et al., 1994)? Actualment se sap que no és tant la longitud de la seqüència telomèrica la que indueix l'entrada de les cèl·lules en senescència, sinó que és la desestructuració del llaç telomèric la responsable d'activar els mecanismes d'aturada del cicle cel·lular (Karlsson et al., 2002). La longitud de la seqüència telomèrica s'escurça en cada ronda de replicació del DNA

aproximadament en uns 50-100 parells de bases (*base pairs*, bp). A nivell molecular aquest escurçament és causat en part per la incapacitat de la DNA polimerasa III, encarregada de la replicació del DNA, de sintetitzar de forma completa l'extrem 3' de la nova cadena de DNA (**Caixa 7**).

Caixa 7 | Problema de fi de replicació

La DNA polimerasa requereix un encebador de RNA a partir del qual afegeix la nova cadena en la direcció 5'→3'. A l'extrem d'un cromosoma lineal, la DNA polimerasa pot sintetitzar la cadena contínua fins al final del cromosoma. Per contra, en la cadena retardada la seva síntesi consisteix en una serie de fragments -coneguts com a fragments d'Okazaki- amb els seus corresponents encebadors. Els RNA encebadors dels fragments d'Okazaki interns van sent substituïts per DNA sintetitzat per la pròpia DNA polimerasa. Per contra, l'encebador del fragment que es troba a l'extrem del cromosoma no pot ésser substituït per la maquinària de replicació convencional. El resultat és una disminució de la longitud telomèrica d'aquesta cadena, fenomen conegut com a "problema de fi de replicació" (Olovnikov, 1973; Watson, 1972).

Encebador d'RNA
 Cadena parental
 Cadena contínua
 Cadena retardada

Tot plegat fa que els telòmers de les cèl·lules esdevinguin més i més curts amb les successives divisions, fins que la seqüència telomèrica assoleix una longitud críticament curta (Allsopp et al., 1992). La presència d'extrems telomèrics amb longituds que no permeten la formació del llaç-T (telòmers disfuncionals) desencadena la **senescència replicativa**. En el cas dels fibroblasts humans, aquesta resposta cel·lular està mitjançada per vies de senyalització relacionades amb p16^{INK4a}/pRb (Kiyono et al., 1998) i p53 (Chin et al., 1999; Sharpless et al., 2002). Mentre que en cèl·lules de ratolí p16^{INK4a} no es troba involucrada en la senescència replicativa (Smogorzewska and de Lange, 2002).

La disfunció telomèrica constitueix un estrès per les cèl·lules, això fa que la seva presència pugui desencadenar altres respostes cel·lulars com l'**apoptosi**. Aquesta, tant en cèl·lules de ratolí com en cèl·lules humanes, és una resposta mitjançada per la via de p53 (Karseder et al., 1999). Així, una mateixa via pot produir diferents respostes segons la intensitat de l'estímul i el tipus cel·lular (Vousden and Lane, 2007). En el cas de la disfunció telomèrica, aquesta pot induir la senescència replicativa (Elmore et al., 2002; Lechel et al., 2005; Martinez et al., 2009) o l'apoptosi per la via de p53 segons els nivells de disfunció telomèrica (Lechel et al., 2005).

Conseqüències de la disfunció telomèrica

La disfunció telomèrica fa referència a la pèrdua de l'estructura de llaç telomèric, estat que pot assolir-se tant per la pèrdua de funció d'alguna de les proteïnes que formen part del complex *shelterin*, com per l'escurçament de la seqüència telomèrica per sota de la seva longitud funcional (**Figura 12**). Quan la disfunció telomèrica es combina amb defectes en el cicle cel·lular (defectes en les vies de p53 i/o en pRb), les cèl·lules poden seguir proliferant tot i presentar longituds críticament curtes. Durant el cultiu de fibroblast, la invalidació d'ambdues vies permet sobrepassar la senescència (Shay et al., 1991) i les cèl·lules proliferen fins que finalment el cultiu entra en una segona fase de *plateau* coneguda com a crisi.

El que succeeix a nivell molecular durant el període de post-senescència és l'aparició progressiva de telòmers lineals, els quals són reconeguts per la maquinària cel·lular com a DSBs (d'Adda di Fagagna et al., 2003). Els telòmers disfuncionals són processats pel sistema de reparació de NHEJ (Celli and de Lange, 2005; Celli et al., 2006) i poden ser fusionats amb un altre telòmer erosionat originant cromosomes dicèntrics (Counter et al., 1992). Aquestes reorganitzacions cromosòmiques són susceptibles d'entrar en cicles BFB i desencadenar una inestabilitat cromosòmica rampant. D'acord amb aquest fet, els fibroblasts que es troben en la fase de crisi presenten cariotips reorganitzats amb fusions cromosòmiques i translocacions no recíproques (Shay and Wright, 2005; Wright and Shay, 1992). I no només això, sinó que la disfunció telomèrica imposa una pressió selectiva al cultiu alhora que és font de mutació (Hackett et al., 2001). Tot plegat permet l'aparició ocasional (1 en 10^7) de cèl·lules amb capacitat per proliferar indefinidament (Wright and Shay, 1992) degut a que activen telomerasa o ALT. En conjunt, aquestes observacions suggereixen que, per a la proliferació il·limitada de les cèl·lules, cal la restitució de mecanismes que permetin l'elongació de les seqüències telomèriques.

Aquests processos de selecció als quals estan sotmeses les cèl·lules en cultiu, i que alhora els permeten passar per les diferents fases fins a assolir la immortalitat (Wright et al., 1989), s'han comparat amb els passos que han de seguir les cèl·lules proliferants *in vivo* fins esdevenir tumorals. Així doncs, la senescència replicativa constituiria una barrera per evitar el desenvolupament tumoral. D'acord amb aquesta hipòtesi, a les lesions tumorals pre-malignes s'hi observen cèl·lules senescentes (Collado et al., 2005), mentre que els adenocarcinomes (tumor maligne) no se n'hi observen (Collado et al., 2005).

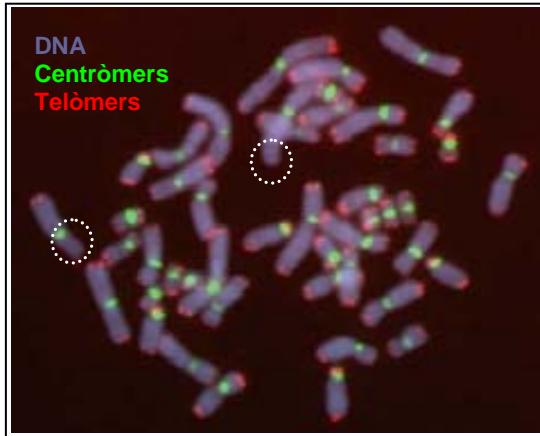


Figura 12. Hibridació *in situ* amb sondes pantelomèriques i pancentromèriques sobre cromosomes metafàsics. Cromosomes (en blau) hibridats amb sondes pantelomèriques i pancentromèriques. L'absència de senyal telomèric en alguns extrems cromosòmics (cercles discontinus) és indicadora de seqüències telomèriques críticament curtes.

Model de carcinogènesi epitelial deguda a disfunció telomèrica

Durant l'última dècada, diferents estudis utilitzant models murins deficientes per a la subunitat conté l'RNA de la telomerasa *mTerc* (Blasco et al., 1997) han permès perfilar la influència dels telòmers en la tumorigènesi. Un estudi clau l'any 2000 relacionà la disfunció telomèrica amb l'aparició de carcinomes en ratolins (Artandi et al., 2000). En aquest estudi es van generar ratolins modificats genèticament que presentaven alhora una mutació en homozigosi del gen *mTerc*^{-/-} i una mutació en heterozigosi del gen de p53. Les primeres generacions de ratolins *mTerc*^{-/-}/*p53*^{+/-} presentaven una longitud telomèrica funcional encara que no tinguessin activitat telomerasa mentre que a les generacions avançades es feia palès el fenotip telomèric. L'anàlisi dels tipus de tumors que afectaven ratolins *mTerc*^{-/-}/*p53*^{+/-} de generacions primerenques demostrà una elevada incidència de tumors limfoproliferatius. Els mateixos que típicament apareixen en ratolins salvatges i ratolins defectius en p53 (DePinho, 2000; Donehower et al., 1992), encara que en una freqüència incrementada. Per contra, en aquells ratolins que mostraven fenotip telomèric s'observà un canvi en l'espectre tumoral, passant aquests de limfoproliferatius a carcinomes (Artandi et al., 2000). En aquest estudi es va demostrar que la disfunció telomèrica en ambients proliferatius permissius (conferits per l'haploinsuficiència de p53) permetia l'aparició de tumors sòlids de tipus carcinoma.

En humans, les conseqüències de la disfunció telomèrica progressiva s'han pogut determinar gràcies a l'estudi de pacients amb síndromes d'escurçament telomèric (*revisat* a Armanios, 2009). Els defectes en TERC o TERT donen lloc a síndromes d'escurçament

telomèric que cursen amb l'aparició d'envelliment prematur. La Disqueratosi Congènita n'és una. A més de presentar anèmia aplàstica i fallida medul·lar, els pacients amb aquesta síndrome mostren un augment en la incidència de tumors limfoproliferatius i de carcinomes (Armanios, 2009). Però el potencial tumorigènic de la disfunció telomèrica en humans també es fa palès en altres síndromes que cursen amb disfunció telomèrica. Un exemple el trobem en la Síndrome de Werner (Crabbe et al., 2007), on els individus afectes presenten una mutació en el gen WRN, el qual codifica per una proteïna helicasa. El defecte en aquesta proteïna causa una síntesi defectuosa als extrems telomèrics de les cadenes retardades (Crabbe et al., 2004), la qual condueix a l'aparició de disfunció telomèrica. Els individus amb la Síndrome de Werner presenten una predisposició incrementada a patir tumors. Tot plegat posa de rellevància la importància del manteniment de la funció telomèrica per evitar el desenvolupament tumoral.

Queda clar doncs que la disfunció telomèrica està vinculada a l'aparició de carcinomes tant en el cas del ratolins *mTerc*^{-/-}/*p53*^{+/-} com en síndromes humanes relacionades amb disfunció telomèrica. Però guarda la longitud telomèrica relació amb l'aparició de carcinomes esporàdics? En primer lloc, l'escurçament telomèric fisiològic progressiu en humans amb l'edat es dona principalment en teixits proliferatius, sobretot els que constitueixen els epitelis que s'han d'anar renovant constantment. Mentre que teixits com el cervell o el miocardi, on les cèl·lules es troben en estat quiescent, exhibeixen longituds telomèriques constants al llarg de la vida dels individus (Djojotubroto et al., 2003). En les últimes dècades de vida d'un individu s'observa un augment en la incidència de tumors epitelials, fet que coincideix amb que la longitud telomèrica dels epitelis és relativament curta. Per contra, els tumors que apareixen en edats pediàtriques, quan la longitud telomèrica és relativament llarga, són bàsicament limfoproliferatius (DePinho, 2000). Per tant, la epidemiologia del càncer mostra una correlació entre l'edat dels individus, la longitud telomèrica i l'aparició de carcinomes. Però quines evidències deixen entreveure els estudis *in situ* dels tumors? Sembla que la disfunció telomèrica constitueix un mecanisme generador d'instabilitat cromosòmica durant els processos de carcinogènesi. Les cèl·lules dels tumors sòlids presenten telòmers significativament més curts que els teixits normals que envolten la lesió, a més de ponts anafàsics (Gisselsson, 2002; Gisselsson et al., 2000; Meeker et al., 2004; Rudolph et al., 2001). L'entrada de cromosomes dicèntrics formats per fusió de cromosomes amb telòmers disfuncionals en cicles BFB podria explicar l'ampli ventall de reorganitzacions cromosòmiques que exhibeixen els cariotips les cèl·lules dels carcinomes (Gisselsson, 2001). Tot plegat ha

permès dibuixar un model de carcinogènesi epitelial, on l'escurçament telomèric fisiològic progressiu que pateixen les cèl·lules dels epitelis conjuntament amb defectes en gens implicats en el control del cicle cel·lular pot desencadenar una inestabilitat cromosòmica massiva que en última instància causaria l'aparició del tumor.

1.4 Cèl·lules Epiteliales Mamàries Humanes

Les conseqüències de la disfunció telomèrica poden estudiar-se mitjançant diversos models cel·lulars. Típicament s'han utilitzat línies cel·lulars derivades de tumors, ja que al ser línies immortals poden cultivar-se indefinidament. A més, la majoria d'elles presenten elevades taxes de proliferació i són relativament fàcils de mantenir en cultiu. Malgrat això, s'ha de tenir en consideració que les cèl·lules derivades de tumors presenten un elevat grau de modificació a nivell de genoma. Aquest fet pot conduir a resultats erronis, ja que un mateix fenotip -en aquest cas la inestabilitat cromosòmica- pot deure's a diverses causes. Un exemple és el cas de les línies de càncer colo-rectals amb CIN, on la inestabilitat cromosòmica que exhibeixen s'ha atribuït a tres mecanismes diferents: la presència d'unions merotèliques (Silkworth et al., 2009), la sobreexpressió d'Aurora-A (Nishida et al., 2007) i la presència de disfunció telomèrica (Stewenius et al., 2005). Un altre contrapunt per a l'estudi de la disfunció telomèrica en línies tumorals és que presenten homeòstasi telomèrica, ja sigui perquè expressen l'enzim telomerasa o ALT. Tot plegat fa que aquestes no siguin el model òptim per avaluar les conseqüències de la disfunció telomèrica, en referència a la generació de CIN.

Una eina valuosa per a l'estudi dels esdeveniments que succeeixen durant els processos de carcinogènesi són els models cel·lulars derivats de teixits normals. Aquests tenen l'avantatge de ser més nets i no haver estat sotmesos encara a les fortes pressions selectives que hi ha sobre les cèl·lules dels tumors, característiques especialment interessants per a l'estudi de les primeres etapes del desenvolupament tumoral. En aquest sentit, els estudis sobre el paper de la disfunció telomèrica durant la carcinogènesi s'ha dut a terme en fibroblasts i cèl·lules epitelials cultivades *in vitro* i transformades mitjançant l'expressió d'oncoproteïnes virals, com la E6 i E7 del HPV. Tot i que aquestes línies són més naïf que les tumorals, cal tenir en compte que E6 i E7 inactiven dues proteïnes, p53 i pRb, que regulen la transcripció de molts altres gens. Un dels models menys modificats genèticament és el que proporciona el cultiu *in vitro* de cèl·lules

epitelials mamàries humanes (*Human mammary epithelial cells* o HMECs) derivades de reduccions mamàries estètiques de donants sanes (*vegeu propers apartats*). Estudis utilitzant aquest model cel·lular han suggerit que els canvis genòmics que sofreixen aquestes cèl·lules durant el seu cultiu *in vitro* són remarcablement semblants als que ocorren en el carcinoma de mama des d'hiperplàsia ductal a carcinoma *in situ* (Chin et al., 2004).

1.4.1 Característiques del cultiu *in vitro* de les HMECs

A diferència dels fibroblasts mamaris, les HMECs exhibeixen *in vitro* una primera fase de proliferació activa fins que assoleixen una barrera proliferativa induïda per estrès en cultiu (**Figura 13**) (Ramirez et al., 2001). En aquest punt les cèl·lules expressen nivells elevats de p16^{INK4a} (producte del gen *CDKN2A*). Malgrat tot, el cultiu continuat d'aquestes cèl·lules en medi lliure de sèrum permet que algunes d'elles se seleccionin i continuïn dividint-se. A nivell molecular s'ha observat que el que permet aquesta selecció és la manca d'expressió de p16^{INK4a} per un canvi en el patró de metilació del promotor del seu gen (Brenner et al., 1998). Aquest fet condueix a una fosforilació inapropiada de pRb i a una pèrdua del control del cicle cel·lular (*vegeu via de pRb, Caixa 1*).

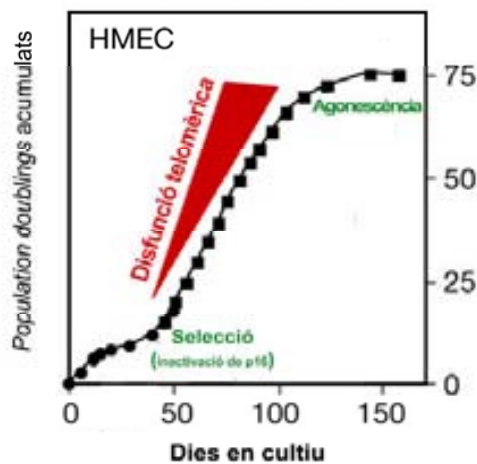


Figura 13. Fases del cultiu *in vitro* de les cèl·lules epitelials mamàries humanes. Les cèl·lules proliferen de manera exponencial fins que assoleixen un primer *plateau*. Amb la inactivació del gen de p16^{INK4a} les HMECs entren a la fase de post-selecció caracteritzada per la presència de disfunció telomèrica. Després d'uns PDs les cèl·lules entren en una segona fase de *plateau*, la qual correspon a l'agonescència. (*Modificat de Romanov et al., 2001*).

Les HMECs que emergeixen de la fase de selecció (HMECs post-seleccionades) poden proliferar un nombre addicional de vegades fins que assoleixen un segon *plateau* anomenat agonescència (a *population doublings*, PDs 70-75). Aquesta segona barrera de creixement depèn de p53 i és equivalent a la barrera de senescència exhibida pel cultiu

de fibroblast, ja que ambdues depenen de la longitud telomèrica. Per tant, la contínua proliferació d'aquestes cèl·lules en absència de telomerasa condueix a una inestabilitat cromosòmica massiva a conseqüència de la disfunció telomèrica, que finalitza en senescència, si les HMECs tenen p53 funcional, bé en mort cel·lular si són deficientes per p53 (Garbe et al., 2007).

1.4.2 Particularitats de les HMECs en la fase de post-selecció: CIN dependent d'erosió telomèrica

Les HMECs són cèl·lules somàtiques que, al no presentar activitat telomerasa, escurcen la longitud dels seus telòmers a mesura que proliferen. Malgrat que la fase II de la corba de cultiu de fibroblast (**Figura 11**) s'ha equiparat amb la fase de post-selecció de les HMECs (**Figura 13**), la longitud telomèrica que presenten els dos tipus cel·lulars en aquestes fases no és equivalent. Els fibroblasts arriben a la crisi cel·lular amb telòmers críticament curts, però encara funcionals (Romanov, 2001). Per contra, les HMECs presenten una longitud telomèrica per sota dels límits de la funcionalitat quan es troben a la fase de post-selecció (Romanov, 2001). En les HMECs després de la selecció (PDs 16-20), la progressiva erosió telomèrica genera una desprotecció paulatina dels extrems cromosòmics. En estadis inicials afecta a pocs extrems cromosòmics, però a mesura que disminueix la longitud telomèrica, van apareixent cada cop més extrems cromosòmics desprotegits. Aquesta fase de disfunció telomèrica massiva (**Figura 13**) està associada a la formació i acumulació de reorganitzacions cromosòmiques típiques de cromosomes desprotegits com ara cromosomes/àtides dicèntrics/ques o cromosomes en anell (Romanov, 2001; Soler et al., 2005; Tusell et al., 2008). L'entrada d'aquestes configuracions cromosòmiques en cicles BFB (*explicat apartat 1.2.2*) genera la formació de reorganitzacions secundàries com ara delecions, amplificacions i translocacions cromosòmiques entre d'altres. Així doncs, la disfunció telomèrica en les HMECs post-seleccionades genera una S-CIN que es manifesta en PDs tardans amb la presència de cariotips altament remodelats (Romanov, 2001; Soler et al., 2005; Tusell et al., 2008).

És important destacar que estudis realitzats en el nostre grup de recerca han permès determinar que els cromosomes implicats en la S-CIN difereixen entre les HMECs derivades de diferents donants (Soler et al., 2005). Aquest fet es deu a que la llargada dels telòmers dels diferents braços cromosòmics depèn de cada individu (Lansdorp et al., 1996), sent un factor genèticament predeterminat i definit a nivell de zigot (Graakjaer et

al., 2004; Londono-Vallejo, 2004). És més, aquesta heterogeneïtat s'observa a altres nivells ja que en un mateix individu també existeixen diferències entre les longituds exhibides per cèl·lules procedents de diferents teixits. Aquest fet vindria determinat per la taxa de recanvi cel·lular com a resposta a diferents estils de vida o estats patològics com ara processos inflamatoris crònics (Benetos et al., 2004; Huda et al., 2007; Jeanclos et al., 2000). Tot plegat, fa que cada extrem telomèric presenti una longitud concreta (Hemann et al., 2001; Lansdorp et al., 1996). Conseqüentment durant el cultiu de les HMECs post-seleccionades els extrems que primer queden protegits són aquells que inicialment eren més curts i són diferents en cada donant (Soler et al., 2005).

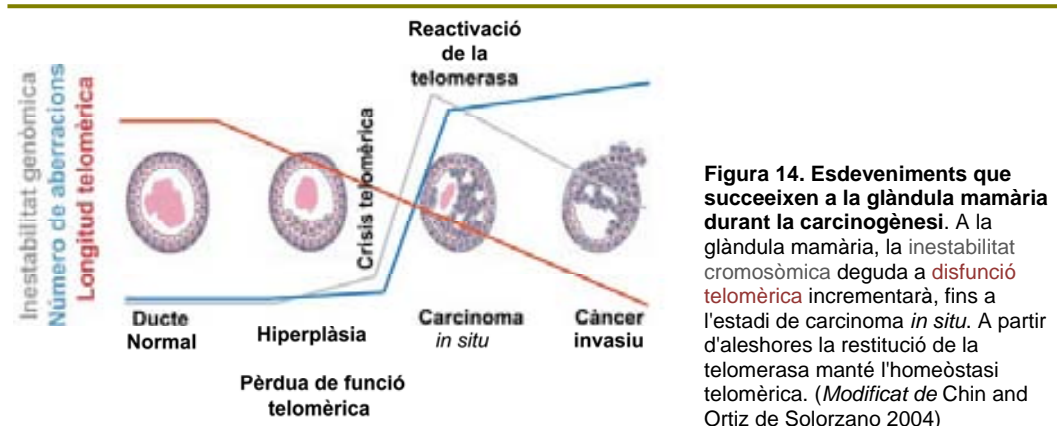
La inestabilitat cromosòmica per disfunció telomèrica que exhibeixen les HMECs durant la fase de post-selecció és majoritàriament de tipus S-CIN (Romanov, 2001; Soler et al., 2005). Això és degut a que el destí majoritari dels ponts anafàsics és el seu trencament (**Treball I**, Pampalona et al., 2010a). No obstant això, les HMECs exhibeixen cariotips aneuploides i poliploides, sent aquests últims evidents en etapes més tardanes del cultiu. Els mecanismes moleculars que permeten l'aparició d'anomalies en el nombre de cromosomes es presenten en aquesta tesi: **Treball II** (Pampalona et al., 2010b), **Treball III** (Pampalona et al., 2010; en preparació) i **treball IV** (Pampalona et al.; en procés d'avaluació).

1.4.3 Les HMECs com a model d'estudi de la carcinogènesi mamària

En els últims anys s'han anat acumulat diferents evidències que mostren que els esdeveniments que ocorren al llarg del cultiu *in vitro* de les HMECs són remarcadament similars als que succeeixen *in vivo* a la glàndula mamària durant els processos de carcinogènesi (**Figura 14**).

A nivell d'expressió gènica, de forma equivalent a l'increment en l'expressió de p16^{INK4a} mostrat per les HMECs fins a la fase de selecció, també existeix un augment en l'expressió d'aquesta proteïna en la glàndula mamària paral·lel a l'edat (Krishnamurthy et al., 2006; Melk et al., 2004; Nielsen et al., 1999). En quan al silenciament espontani del gen de p16^{INK4a} que s'observa *in vitro* i permet superar la fase de selecció, també s'ha suggerit que podria ser un esdeveniment primerenc de la carcinogènesi mamària ja que s'han observat foci de cèl·lules amb el promotor del gen de p16^{INK4a} metilat en un 40% de

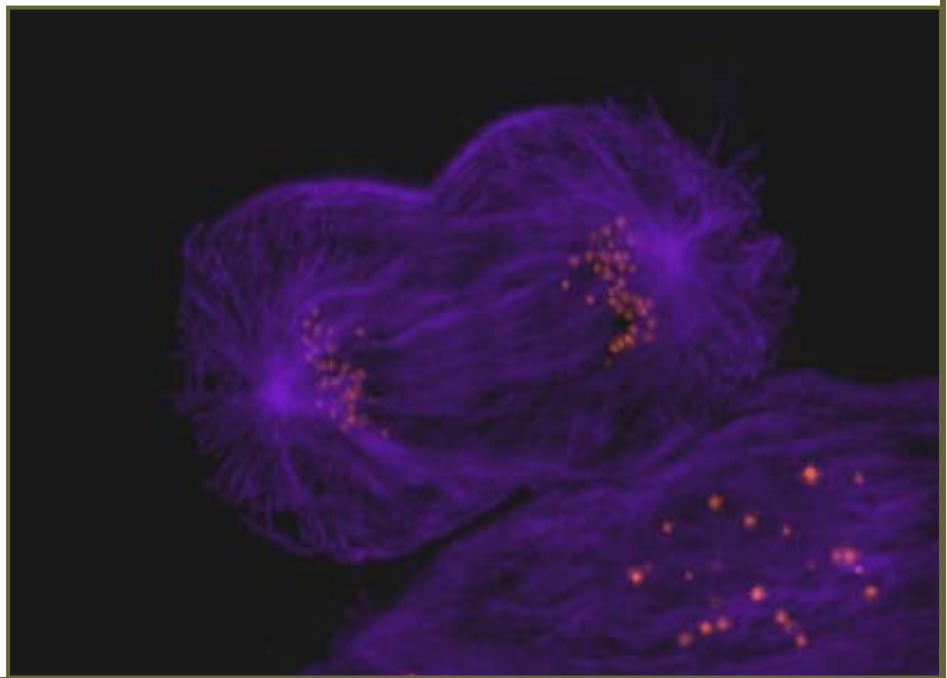
les mostres de teixit mamari histològicament normal de dones sense càncer de mama ni predisposició a tenir-lo (Brenner et al., 1998; Holst et al., 2003). També s'ha descrit que els perfils d'expressió gènica propis de les HMECs immortalitzades coincideixen amb els exhibits per cèl·lules provinents de càncers de mama no invasius (carcinoma *in situ* ductal o lobular) (Li et al., 2007).



A nivell cel·lular, les HMECs post-seleccionades presenten nivells de CIN que incrementen fins a la fase de crisi, i disminueixen amb la immortalització (reactivació de la telomerasa). Aquesta evolució de la CIN a la glàndula mamària ocorre durant la transició d'hiperplàsia ductal (lesió pre-maligna) a carcinoma *in situ* (Chin et al., 2004) (**Figura 14**). Encara que la longitud telomèrica global disminueix durant tot el procés de carcinogènesi aquest fet no significa que hi hagi disfunció telomèrica durant tot el procés. Al contrari, la disfunció telomèrica és resolta amb la reactivació de la telomerasa i, d'acord amb aquest fet la inestabilitat cromosòmica disminueix abruptament (**Figura 14**). A més, s'ha observat que la disfunció telomèrica és responsable de l'evolució citogenètica de diversos tumors malignes humans (Gisselsson, 2001; Stewenius et al., 2005). Així doncs, tot plegat indica, que la disfunció telomèrica juga un paper important tant des de l'inici com durant la progressió de la carcinogènesi mamària. D'acord amb això, a la glàndula mamària a més d'observar-se telòmers críticament escurçats en el carcinoma *in situ* i invasiu, també s'han descrit zones dins la mateixa glàndula amb un major escurçament telomèric (Meeker et al., 2004). No obstant això, no se sap si aquestes regions serien especialment susceptibles a fundar el tumor.

A banda de les evidències descrites, hi ha altres fets que succeeixen *in vivo* que també indiquen que la disfunció telomèrica pot tenir un paper important en la carcinogènesi mamària (Meeker et al., 2004; Radpour et al., 2010 ; Raynaud et al., 2009). Per tant, un millor coneixement de les conseqüències de la disfunció telomèrica en HMECs podria ajudar a trobar el taló d'Aquil·les per combatre el desenvolupament de la carcinogènesi mamària. L'estudi de les HMECs al llarg de la seva fase de post-selecció brinda una oportunitat per analitzar els efectes de la disfunció telomèrica a nivell de genoma en ambients genètics sense modificacions per poder ajudar a millorar la comprensió de la carcinogènesi en general.

Hipòtesi i Objectius



2. Hipòtesi i Objectius

La disfunció telomèrica constitueix una font d'instabilitat cromosòmica per la qual les cèl·lules poden acumular els canvis necessaris per adquirir un fenotip tumoral. En aquest sentit, s'ha observat la presència de telòmers especialment curts tant en lesions tumorals pre-malignes com malignes. D'acord amb aquestes observacions, els cariotips de les cèl·lules tumorals sovint exhibeixen reorganitzacions cromosòmiques típiques de disfunció telomèrica com ara fusions cromosòmiques, translocacions no recíproques, amplificacions i delecions. Aquest nivell de reorganització cromosòmica és el resultat de l'entrada de cromosomes dicèntrics en cicles BFB, els quals cursen amb ponts cromatínics durant l'anafase. Però les cèl·lules tumorals, també contenen genomes aneuploides, sovint amb un contingut de DNA proper a la tetraploidia. Altres característiques observades tant en cèl·lules neoplàsiques com en lesions pre-tumorals són l'amplificació centrosòmica i mitosis multipolars, les quals constitueixen una coneguda font d'aneuploidia i W-CIN. El fet que tots aquests fenotips diversos coexisteixin sovint amb un rerefons genètic amb disfunció telomèrica podria indicar que és aquesta manca de protecció telomèrica la responsable de la seva aparició. Amb aquesta premissa la **Hipòtesi** d'aquesta tesi és que existeix una relació entre l'erosió telomèrica i l'aparició d'instabilitat cromosòmica estructural i numèrica, així com d'anomalies en el nombre de dotacions cromosòmiques de les cèl·lules (poliploidies).

D'acord amb els supòsits prèviament descrits, els objectius concrets plantejats foren els següents:

1r Objectiu

- Determinar la presència d'anomalies en la morfologia dels nuclis interfàsics, les quals són signe d'instabilitat cromosòmica. Establir si les morfologies nuclears anòmales tenen un origen comú i si la seva aparició està relacionada amb la disfunció telomèrica de les cèl·lules proliferants.

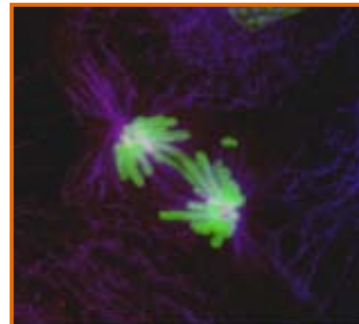
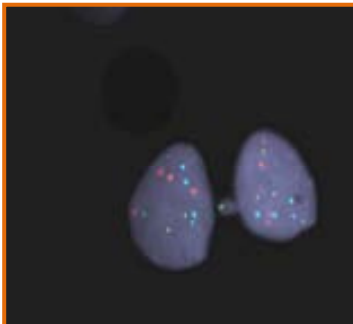
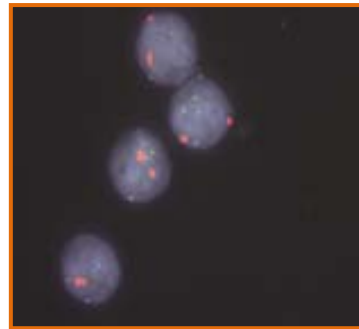
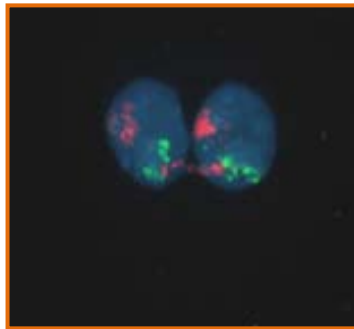
2n Objectiu

- Establir si existeix una relació entre la disfunció telomèrica i la inestabilitat cromosòmica numèrica.
- En el cas que es confirmi aquesta relació, determinar els esdeveniments que permeten l'aparició d'aneuploïdia durant la mitosi de cèl·lules amb disfunció telomèrica.

3n Objectiu

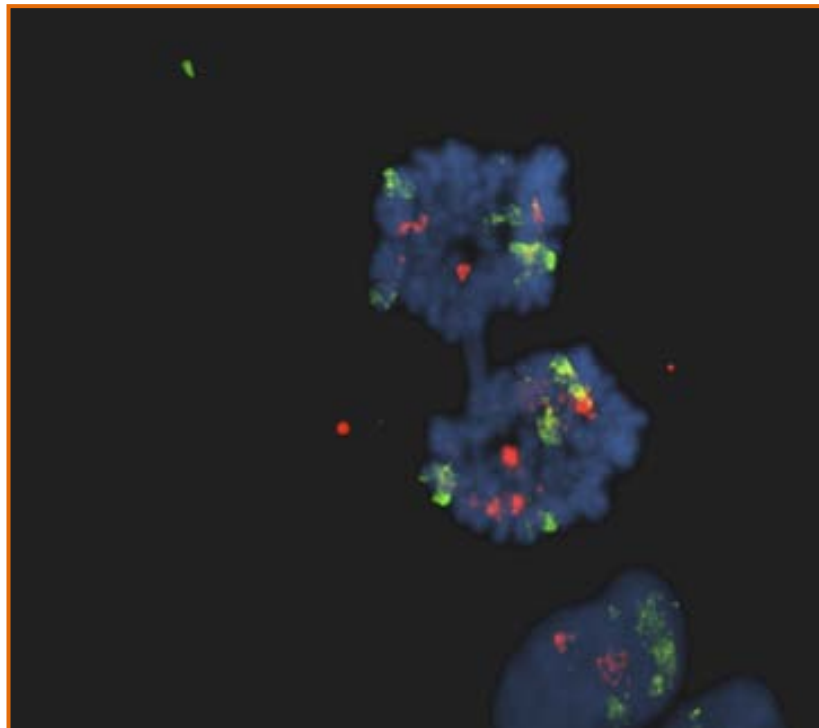
- Identificar si existeix alguna relació entre la disfunció telomèrica i l'aparició de cèl·lules tetraploides. En cas afirmatiu, identificar el mecanisme potencial que ho permet.
- Assenyalar les conseqüències de la poliploidització en un rerefons genètic amb disfunció telomèrica.

Treballs realitzats



Treball I

**Telomere Dysfunction and Chromosome
Structure Modulate the Contribution of
Individual Chromosomes in Abnormal Nuclear
Morphologies**





Contents lists available at ScienceDirect

Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molmut
Community address: www.elsevier.com/locate/mutres



Telomere dysfunction and chromosome structure modulate the contribution of individual chromosomes in abnormal nuclear morphologies

J. Pampalona, D. Soler, A. Genescà, L. Tusell*

Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra E-08193, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 March 2009
Received in revised form 27 July 2009
Accepted 2 October 2009
Available online 12 October 2009

Keywords:

Telomeres
Anaphase bridges
HMEC
Chromosome instability
Nuclear buds

ABSTRACT

The cytokinesis-block micronucleus assay has emerged as a biomarker of chromosome damage relevant to cancer. Although it was initially developed to measure micronuclei, it is also useful for measuring nucleoplasmic bridges and nuclear buds. Abnormal nuclear morphologies are frequently observed in malignant tissues and short-term tumour cell cultures. Changes in chromosome structure and number resulting from chromosome instability are important factors in oncogenesis. Telomeres have become key players in the initiation of chromosome instability related to carcinogenesis by means of breakage–fusion–bridge cycles. To better understand the connection between telomere dysfunction and the appearance of abnormal nuclear morphologies, we have characterised the presence of micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds in human mammary primary epithelial cells. These cells can proliferate beyond the Hayflick limit by spontaneously losing expression of the p16^{INK4a} protein. Progressive telomere shortening leads to the loss of the capping function, and the appearance of end-to-end chromosome fusions that can enter into breakage–fusion–bridge cycles generating massive chromosomal instability. In human mammary epithelial cells, different types of abnormal nuclear morphologies were observed, however only nucleoplasmic bridges and buds increased significantly with population doublings. Fluorescent *in situ* hybridisation using centromeric and painting specific probes for chromosomes with eroded telomeres has revealed that these chromosomes are preferentially included in the different types of abnormal nuclear morphologies observed, thus reflecting their common origin. Accordingly, real-time imaging of cell divisions enabled us to determine that anaphase bridge resolution was mainly through chromatid breakage and the formation of symmetric buds in daughter nuclei. Few micronuclei emerged in this cell system thus validating the scoring of nucleoplasmic bridges and nuclear buds for measuring chromosome instability in telomere-dysfunction cell environments.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Over the last 30 years, biomarker-based approaches have been employed in environmental carcinogenesis research in the hope of refining exposure assessment and providing tools for the early detection of disease-related changes [1]. Cytogenetic biomarkers such as chromosomal aberrations and micronuclei (MN) are the most frequent endpoints in human population studies. They are widely used for screening exposure to mutagens and carcinogens and are early predictors of cancer risk [2]. Recently, other abnormal nuclear structures such as nucleoplasmic bridges (NPBs) and nuclear buds (Bs) have attracted the interest of researchers as biomarkers of genomic instability.

Micronuclei are formed from chromosomes and chromosome fragments that lag behind during anaphase and are left outside the daughter nuclei in telophase. Moreover, real-time *in vitro* studies in carcinoma cell lines have demonstrated that micronuclei can also be originated by complex chromosomal rearrangements which encounter mechanical difficulties during cell division [3]. Nuclear buds are morphologically similar to micronuclei with the exception that they are joined to the cell nucleus by a thin nucleoplasmic connection. Studies of human tumour cells have indicated that these structures contain amplified DNA sequences that are selectively concentrated at the cell nucleus periphery, which may later be extruded from the cell nucleus to form a micronucleus [4]. In contrast to a nuclear DNA extrusion origin, other authors suggest that the generation of buds may also be explained by the breakage of anaphase bridges [5]. In this case, these nuclear structures would in fact be regressing broken chromatin rather than protruding bodies as their name indicates. Anaphase bridges were first observed by Barbara McClintock after DNA damage in maize chromosomes caused by X-rays [6]. She determined that

* Corresponding author at: Cell Biology Unit, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, School of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain. Tel.: +34 93 5811498; fax: +34 93 5812295.

E-mail address: laura.tusell@uab.es (L. Tusell).

radiation-induced broken chromosomes can misrepair their ends leading to the formation of dicentric chromosomes that can be attached to both spindle poles. During division the two centromeres are pulled towards opposite poles creating an anaphase bridge. This bridge may then break, resulting in new chromosome free ends that can fuse again with other broken extremities, perpetuating a breakage–fusion–bridge (BFB) cycle. Alternatively, anaphase bridges can originate from extensive telomere shortening, when telomere uncapping leads to chromosome end-to-end fusion [7,8]. Telomeres, the specialised structures at chromosome ends, are essential for maintaining the stability of eukaryotic genomes by protecting natural ends from recombination and enabling cells to distinguish them from random DNA breaks.

Telomere integrity appears to be a critical element in the evolution of cancer. Numerous studies, mostly based on mouse models, clearly involve dysfunctional telomeres in the early phases of cancer development. A dysfunctional telomere-driven chromosomal instability model has been proposed to explain the origin of epithelial cancers [9]. This model postulates that the telomere–telomere fusions originated by non-balanced age dependent telomere erosion in proliferating epithelial cells together with frequent cell cycle checkpoint inactivation, could generate the major chromosomal instability that is responsible for initiating epithelial carcinogenesis in humans [10,11]. Anaphase bridges have been closely related to chromosomal instability in human tumour samples [12–14] and with tumourigenesis in mice [10,15]. It is therefore of relevant interest to ascertain whether genomic instability mediated by telomere dysfunctionality can be associated with the induction of micronuclei, buds and nucleoplasmatic bridges. We have assayed the usefulness of these biomarkers in human mammary epithelial cells (HMECs) derived from cosmetic breast reductions of healthy women. This cell system has proved to be a valuable tool in determining the initial pathways of carcinogenesis in human breast cancer [16]. It has been shown that HMECs spontaneously lose expression of the p16^{INK4a} protein allowing *in vitro* proliferation of these cells beyond the Hayflick limit [17]. The continuous erosion of telomeric sequences in these cells ultimately leads to massive chromosomal instability generating the types of chromosomal abnormalities seen in the earliest stages of breast cancer [18–20].

Our studies of HMEC demonstrate that chromosome instability is manifested by an increasing formation of abnormal nuclear morphologies (ANMs) throughout the cell culture. In these cells NPB scoring has been a valuable tool, better than micronucleus scoring, for measuring ongoing instability. The use of DNA probes for selected chromosomes as well as real-time analysis of bridge resolution has provided information about the origin and fate of ANMs. In HMECs, chromosomes with eroded telomeres were mainly included in NPBs, MN and Bs. This observation, together with the internal location of MN and Bs in binucleated cells relative to the cell nucleus, provides evidence of a common origin for all ANMs. This hypothesis has been confirmed by the observation that both buds, predominantly, and micronuclei, to a lesser extent, arise after NPB breakage. All these results validate NPBs and Bs as biomarkers of chromosomal damage in a telomere-dysfunction cell environment.

2. Materials and methods

2.1. Cells and culture conditions

219-7 HMECs (BioWhittaker; Walkersville, MD) were derived from normal breast tissue. Cells were cultured in serum-free MEGM medium (BioWhittaker) and supplemented with epidermal growth factor, insulin, hydrocortisone, gentamicin/amphotericin-B and bovine pituitary extract. The cells were counted, plated at 2×10^5 cells per 75 cm² flasks and grown at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. The number of accumulated population doublings (PDs) per passage was determined using the equation $PD = \text{initial PD} + \log(\text{no. viable cells harvested}/\text{no. viable$

cells plated)/log2. The finite life span of post-selection HMECs when cultured in MEGM medium is about 22 passages, equivalent to approximately 65–75 PDs.

2.2. Cytokinesis-block micronucleus assay and metaphase preparations

Exponentially growing binucleated HMECs were obtained after adding cytochalasin B (2 mg/ml stock solution in dimethyl sulfoxide; Sigma; St. Louis, MO) at a final concentration of 6 µg/ml before harvesting the culture so as to block cytokinesis [21]. The tubes were centrifuged at 220 × g for 8 min, followed by hypotonic shock and three rounds of methanol/acetic fixation. Metaphase spreads were obtained after treatment with colcemid 0.02 µg/ml for 8 h, followed by hypotonic shock and methanol/acetic fixation. Cell suspensions were dropped onto clean slides, which were stored at –20 °C. Before hybridisation, the slides were mounted in antifade solution containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma) at a final concentration of 0.125 µg/ml. This enables good morphology chromosomes to be karyotyped before the denaturation step. After capturing metaphases and recording coordinates, metaphase karyotyping was performed by reverse DAPI staining, which results in a reproducible G band-like pattern that enables accurate identification of each pair of homologous chromosomes.

2.3. Fluorescence in situ hybridisation

2.3.1. PNA-FISH

Telomere and centromere PNA-FISH were performed on metaphase chromosome slides using a Cy3-(CCCTAA)₃ PNA-probe for telomeres and a FITC-AAACACTCTTTTGTAGA probe for centromeres (PE Biosystems; Foster City, CA) [22]. Specific chromosome arms carrying critically short telomeres were identified rather than measuring mean telomeric reduction. Signal-free chromosome ends on the homologous chromosome arms in each analysed metaphase were recorded as a whole because the corresponding homologues, namely maternal and paternal chromosomes of each pair, could not be formally distinguished by G-banding.

2.3.2. Centromeric-FISH and chromosome painting

FISH of binucleated HMECs was performed using a mixture of three commercial probes (Abbott; Abbot Park, IL) that detect the centromeric region of chromosome 1 (CEP 1 Satellite II/III; *Spectrum Orange*) and 4 (CEP4; *Spectrum Aqua*) and the locus BCR region located at 22q11.2 close to the centromere of chromosome 22 (LSI22; *Spectrum Green*). The resulting signals were red, light blue and green for chromosome 1, 4 and 22, respectively. Chromosome painting probes (Abbott; Abbot Park, IL) for chromosome 1 (*Spectrum Orange*) and chromosome 22 (*Spectrum Green*) were also applied to slides. Before hybridisation, the slides were pre-treated with pepsin (0.1 mg/ml, Sigma) in 10 mM HCl and postfixed in 37% formaldehyde in PBS/1 M MgCl₂. The probes were denatured at 75 °C for 5 min, and then applied to slides in which the DNA had been denatured at 75 °C for 5 min in 70% formamide/2×SSC and dehydrated in cold ethanol series. Hybridisation was performed overnight at 37 °C in a moist chamber. The slides were washed for 1 min in 0.4×SSC that was previously warmed at 75 °C and in 2×SSC/0.05% Tween 20 for 5 min at room temperature. Finally, slides were dehydrated and mounted in antifade solution containing DAPI. Fluorescence signals were visualised under an Olympus BX microscope equipped with epifluorescent optics specific for each fluorochrome. Images were captured and analysed using Cytovision software (Applied Imaging, Inc., CA).

2.4. Scoring criteria

A binucleated cell was scored when the distance between the two daughter nuclei was equal to or lower than the radius of one nucleus. Moreover, the main nuclei could touch each other, but cells with overlapping nuclei were not considered. Finally, both daughter nuclei must be approximately equal in size, staining pattern and staining intensity. The analysis of abnormal nuclear morphologies was performed on DAPI counterstained binucleated cells using the criteria described by Fenech [23]. A nucleoplasmic bridge was considered to be the narrow/wide chromatin segment connecting two cell nuclei, micronuclei were morphologically identical to, but smaller than the cell nucleus, and round and oval protrusions of the nuclear membrane, connected to the cell nucleus, were classified as buds [5].

2.5. Transient transfection procedures and time-lapse microscopy

The day before transfection, HMECs were plated into a 35-mm glass bottom dish (MatTek, Ashland, MA) at a density of 7300 cells/cm². Transfection procedures using pEGFP-N1 plasmid encoding H2B-GFP sequence (Addgene Inc., Cambridge, MA) were performed using Fugene HD (Roche Diagnostics S.L., Indianapolis, IN) according to the manufacturer's instructions. Expression of the H2B protein fused with GFP was analysed under an inverted fluorescence microscope 24–48 h after transfection, while live cell imaging was performed in a Leica TCS SP5 confocal microscope. Cells were visualised with a HCX PL APO CS 40.0×1.25 OIL UV objective using the 488 nm line from an argon laser. Mitotic cells were imaged at 3× zoom using the software Leica LAS AF Lite (Leica Microsystems, Inc., Germany) for 2–4 h, at intervals of 3 min. Acquisition settings were established at 10% laser power through a pinhole of 5 AU, a line average of 2, and a scan speed of 400 Hz to avoid excessive cellular damage. Throughout the entire process, cells were kept at 37 °C and 5% CO₂.

2.6. Statistical analysis

All of the frequencies were calculated on the basis of events that occurred. The one-way analysis of variance (ANOVA) test was used to examine whether there was a preferred implication of specific chromosomes in ANM. To compare the incidence of abnormal nuclear morphologies at different population doublings and also to determine differences between the implication of chromosomes with and without critical short telomeres in ANMs, Student's *t*-tests were performed. All the statistical analysis was performed using the SPSS14.0 (SPSS, Inc.) statistical package.

3. Results

3.1. Abnormal nuclear morphologies, a hallmark of ongoing genomic instability, increase with PDs in HMECs

Abnormal nuclear morphologies are good indicators of the chromosomal instability of cells since they often originate from mitotically unstable dicentric chromosomes and lagging acentric fragments and/or whole chromosomes. In order to determine the existence of ongoing chromosomal instability in HMECs throughout its *in vitro* culture, the presence of ANMs was analysed in binucleated cells at PD25 and PD36. According to Thomas et al. [24], the use of a binucleated cell assay is one of the best and simplest methods to measure abnormal nuclear morphologies because the inhibition of cytokinesis prevents the loss of these structures, which would otherwise occur if cell division was complete. The analysis of binucleated HMECs stained with the fluorescent stain DAPI enabled three major types of ANM to be observed, namely nucleoplasmic bridges, micronuclei and nuclear buds (Fig. 1A). The frequency of ANM in HMECs was obtained after the analysis of 1143 binucleated cells at PD25 and 2179 binucleates at PD36. A significant increase in the total frequency of ANMs per binucleate was observed through the HMEC's culture: at PD25, 0.04 ANMs per binucleate were observed while at PD36 the frequency increased to 0.21 ANM/binucleate (Student's *t*, $p < 0.05$) (Fig. 1B). At the beginning of the culture, no type of abnormal nuclear morphology predominated significantly over the others (ANOVA, $p = 0.161$). In contrast, at PD36, nucleoplasmic bridges were the predominant ANM, accounting for 72.4% of all the observed anomalies, while Bs and MN accounted for 21.0% and 6.6%, respectively. When the induction of each type of ANM was analysed throughout the culture, a significant increase in the frequency of NPBs and Bs was found (Student's *t*, $p < 0.05$). In contrast, no statistical differences were observed in the frequency of MN from PD25 to PD36 ($p = 0.109$). Altogether, these observations demonstrate an increase in ANM throughout the HMEC's culture, which is mainly manifested by the presence of NPBs. And more importantly, they support the use of NPB and B scoring as useful biomarkers of chromosomal instability.

It is a well established fact that NPBs derive from unstable dicentric chromosomes. In contrast, different mechanistic origins have

Table 1

Abnormal nuclear morphologies resulting from broken NPBs.

		N	Relative freq
27 anaphase bridges	No ANM	1	0.037
	Bilateral buds	20 ^a	0.741
	Unilateral buds	1	0.037
	Micronuclei	7 ^a	0.259

^a Two anaphase bridges created both buds and micronuclei.

been proposed for MN and nuclear Bs. To determine whether there is a relationship between NPBs and the formation of MN and Bs, sister nuclei in each binucleated epithelial cell were divided into two halves, one internal half facing the sister nucleus and one external half. In our study, 71% of MN and 88% of Bs were located in the internal halves of the sister nuclei, thus supporting the idea that not only MN but also nuclear Bs can be remnants of broken nucleoplasmic bridges. To further support this idea, real-time analysis of primary HMECs transfected with a plasmid expressing GFP-tagged histone H2B was performed to image anaphase bridge resolution. To determine the fate of bridges, 42 cells in anaphase with a total of 44 chromatin connections between both segregation chromosome complements were identified and followed-up until division was complete. Of the 44 chromatin bridges, 27 (61.4%) broke at anaphase (Table 1). In HMECs, the broken anaphase bridges mainly gave rise to the formation of nuclear buds (77.8%), which were nearly always observed to occur bilaterally, i.e. one nuclear B in each daughter nuclei after the NPB breakage (Fig. 2). At the end of the time-lapse recording, eleven out of twenty-one generated buds were incorporated in the main cell nucleus. Micronuclei were observed to occur after the breakage of 7 anaphase bridges, and no more than one micronucleus was formed after bridge breakage. Therefore, it can be concluded that NPBs can break at anaphase and mainly give rise to the formation of Bs and occasionally to MN, thus revealing a common origin of the three distinct types of ANM.

3.2. ANMs mainly involve chromosomes with short dysfunctional telomeres

To determine whether the telomere shortening that these cells undergo in culture is responsible for the generation of ANMs, the selective inclusion of chromosomes with critically short telomeres in these nuclear structures was examined. Specific chromosomes with eroded telomeres were selected on the basis of telomeric PNA-FISH experiments. The presence of chromosome ends with undetectable TTAGGG hybridisation signals has proved to be a good indicator of critically short and probably dysfunctional telomeres in these chromosomal ends [19,25–27]. Accordingly, chromosome 1 was chosen as a chromosome with eroded telomeres since one of

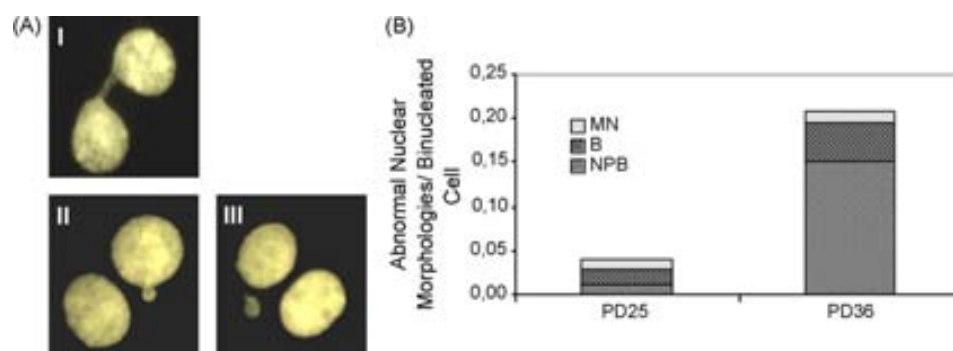


Fig. 1. Analysis of abnormal nuclear morphologies in HMECs. (A) Images of binucleated cell nuclei stained with DAPI showing: (I) a nucleoplasmic bridge (NPB); (II) a nuclear bud (B) and (III) a micronucleus (MN). (B) Frequency of the different abnormal nuclear morphologies per binucleate at PD25 (12 NPBs, 21 Bs and 12 MN in 1143 binucleates) and PD36 (328 NPBs, 95 Bs and 30 MN in 2179 binucleates).

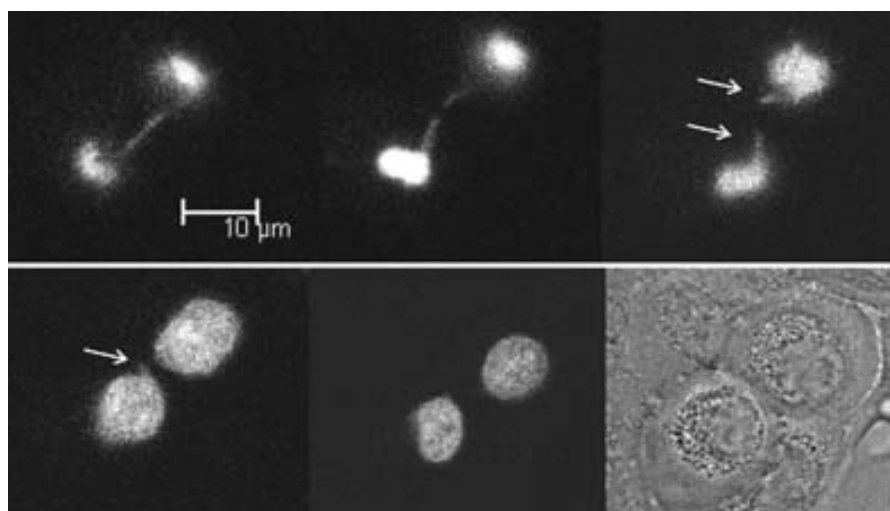


Fig. 2. Chromatin bridges in HMECs, transfected with H2B-GFP, often give rise to bilateral buds. In the cell shown in this figure a chromatin bridge breaks in the middle during anaphase. The severed chromatin remains connected to the main nuclei giving rise to bilateral buds (arrow). As the cells enter the next interphase, a regression of nuclear buds is observed. Finally, a contrasting image of the daughter cells shows that cytokinesis is complete.

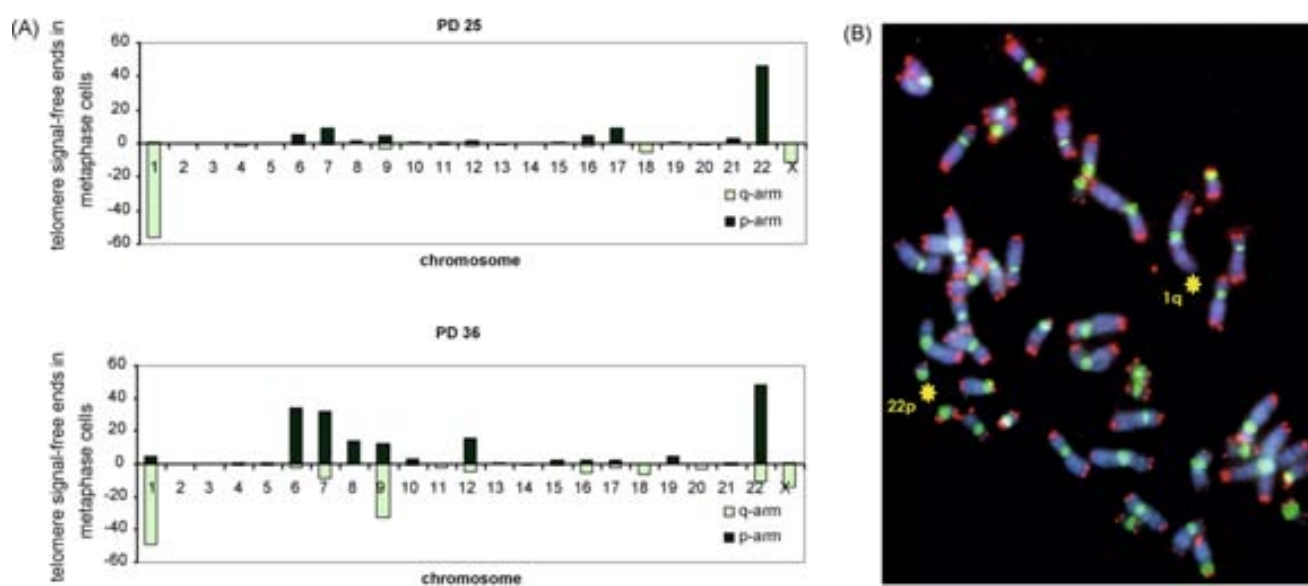


Fig. 3. (A) Distribution of telomere signal-free ends among chromosomes throughout the culture of HMECs at PD25 (108 metaphases analysed) and PD36 (91 metaphases analysed). (B) Metaphase chromosomes hybridised with a pantelomeric and a pancentromeric PNA-probe showing a preferential absence of TTAGGG signals on the long arm of a chromosome 1 and on the short arm of a chromosome 22.

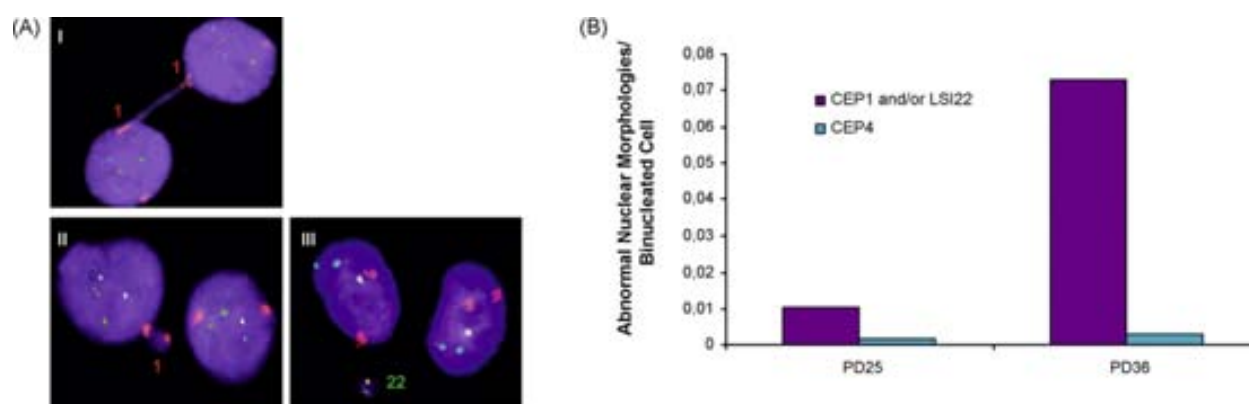


Fig. 4. Involvement of chromosomes with eroded telomeres in ANMs. (A) Images of binucleated HMEC nuclei hybridised with centromeric probes specific for chromosome 1 (red), 4 (light blue) and 22 (green) and showing: (I) a NPB and (II) a bud containing chromosome 1 signals and (III) a micronucleus showing centromeric signals of chromosome 22. (B) Involvement of CEP1, CEP4 and LSI22 in ANMs of binucleates at PD25 and PD36.

the 1q-arm homologues lacked telomere signals, in this donor, in up to 54% of metaphases (Fig. 3). Similarly, one of the chromosome 22p-arm homologues was a telomere-free signal end in around 48% of metaphases. In contrast, chromosome 4 was selected as having a normal telomere length profile as p- and q-arms lacked telomere signals in only 4% of the metaphases analysed (Fig. 3). The preferential involvement of these three chromosomes in ANMs was analysed by centromeric-specific probes for the selected chromosomes at different PDs throughout the culture of the cells (Fig. 4). At PD25, the frequency of ANMs showing CEP1 and/or the pericentromeric BCR locus at 22q11 (LSI22) was 0.0122 per binucleate (Fig. 4B), while it was only 0.0017 for the presence of CEP4 signals. At this point in time, significant differences were found between the implications of these specific chromosomes on ANMs (Student's t , $p < 0.05$). Only the frequency of the CEP1 + LSI22 signals significantly increased through the culture (0.0743 at PD36; Student's t , $p < 0.05$) and it was significantly higher than those corresponding to chromosome 4 (0.0028; Student's t , $p < 0.05$). In order to shed more light on the inclusion of chromosomes with eroded telomeres in ANMs, painting FISH probes for chromosomes 1 and 22 were assayed (Table 2). At PD25, 61.8% of ANMs showed hybridisation signals with the painting of either chromosome 1 or 22. In a similar way, at PD36, the involvement of these two uncapped chromosomes in ANMs prevailed over the other chromosomes (77.7% vs 22.3%). Therefore, these results indicate the preferred involvement of chromosomes with eroded telomeres in ANMs.

However, chromosome 1 and chromosome 22 were not equally involved in ANMs; chromosome 1 being more frequently implicated than chromosome 22 (52.9% vs 17.6% at PD25 and 73.8% vs 7.7% at PD36; ANOVA, $p < 0.05$; Table 2). This result was quite unexpected because both chromosomes showed similar telomere erosion profiles, and it was therefore assumed that they would be equally involved in ANMs. Nevertheless, these differences can be explained by taking into consideration the chromosomal aberrations generated and their probability of involvement in BFB cycles. In HMECs, the most frequent structural chromosome aberrations were telomere-to-telomere fusions that originated mainly from the fusion of two different chromosomes. Interchromosome dicentrics may encounter segregation problems at anaphase if one or more twists between the two centromeres occur during cell division. As a general rule, dicentric chromosomes with a short intercentromeric distance are almost stable, while those with a long intercentromeric

Table 2

Abnormal nuclear morphologies hybridised with the painting of chromosomes 1 and 22 at different population doublings (PDs).

	Total ANM N	w/o Signal ^a Relative freq (N)	#1 Relative freq (N)	#22 Relative freq (N)
PD25				
NPB ^b	10	0.300 (3)	0.600 (6)	0.100 (1)
B ^c	16 ^d	0.375 (6)	0.562 (9)	0.125 (2)
MN ^e	8 ^d	0.500 (4)	0.375 (3)	0.375 (3)
Total	34	0.382 (13)	0.529 (18)	0.176 (6)
PD36				
NPB	178 ^d	0.219 (39)	0.753 (134)	0.062 (11)
B	46 ^d	0.174 (8)	0.740 (34)	0.130 (6)
MN	9 ^d	0.555 (5)	0.444 (4)	0.111 (1)
Total	233	0.223 (52)	0.738 (172)	0.077 (18)

^a w/o Signal: without hybridisation signal.

^b NPB: nucleoplasmic bridge.

^c B: bud.

^d At PD25, 1 bud and 2 micronuclei showed hybridisation signals of both chromosomes. At PD36, the same occurred for 6 nucleoplasmic bridges, 2 buds and 1 micronucleus.

^e MN: micronuclei.

distance have a higher probability of twisting and are therefore highly unstable. In our cells, the most frequent interchromosome fusion was between the long arm of chromosome 1 and the short arm of chromosome 22 [19]. The resulting dicentric chromosome has a large intercentromeric region that mainly consists of the long arm of chromosome 1 (1q is one of the largest arms in the genome, accounting for 127 Mbp in length while 22p is one of the shortest, with only 15 Mbp) (Fig. 5A). If a twist between centromeres on dic (1q;22p) occurs, the resulting nucleoplasmic bridge will mainly come from the long arm of chromosome 1. Indeed, 74.5% of NPBs showed hybridisation signals with the painting of chromosome 1, while only 6.4% hybridised with the painting of chromosome 22 (Table 2). Accordingly, the use of painting probes for chromosomes 1 and 22 confirmed a preference for the inclusion of these chromosomes in Bs and MN (82.3% and 64.7%, respectively). This corroborates the idea that all these nuclear structures have a common origin (Table 2 and Fig. 5B). Taken as a whole, our results indicate that, not only telomere dysfunction, but also chromosome morphology, modulates the involvement of the different chromo-

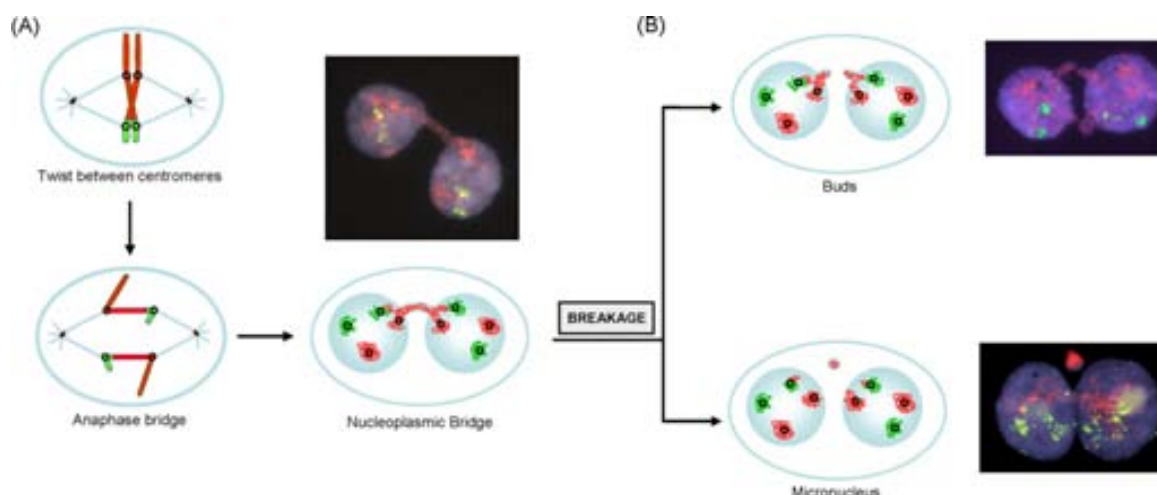


Fig. 5. Schematic representation of dic (1q;22p) segregation. Chromosome 1 is coloured in red and chromosome 22 in green. Open black circles represent the centromere of each chromosome. (A) Dicentric chromosomes may encounter segregation problems at anaphase if a twist between the two centromeres occurs. The resulting anaphase bridge and the subsequent nucleoplasmic bridge are mainly contributed by the long arm of chromosome 1. (B) If the anaphase bridge breaks at only one site, nuclear buds mainly contributed by chromosome 1 will appear. However, if the bridge breaks in two different positions, a micronucleus derived primarily from chromosome 1 will be formed. In both cases, each main nuclei of the BN cell will contain structural chromosomal aberrations but a complete set of centromeres for each chromosome.

somes in ANMs, and consequently the generation of chromosome instability in HMECs.

4. Discussion

Genome instability is a feature of cancer cells and it is widely accepted that it participates in the onset and progression of neoplasia. Nearly all solid tumours exhibit genomic instability at the chromosomal level (CIN), showing both structural chromosomal rearrangements as well as chromosome number abnormalities. Another common feature of a wide variety of cancer cells is the presence of abnormal nuclear morphologies such as nucleoplasmic bridges, micronuclei and nuclear buds [5]. These structures have been proposed as biomarkers of ongoing CIN as they are usually derived from dicentric chromosomes (manifested as NPBs), acentric chromosome fragments (manifested as MN) and chromosome DNA amplification (manifested as Bs) [4,28]. One of the mechanisms for the genesis of CIN is through telomere uncapping. The loss of the t-loop structure by telomere shortening impairs the protection of chromosomal ends and chromosome fusions are formed. These crucial chromosome events may lead to the loss of genome integrity that may cause carcinogenic mutations to arise.

In order to determine whether NPBs, Bs and MN are suitable biomarkers of CIN resulting from telomere dysfunction, the primary human mammary epithelial cell system was used. HMECs lack telomerase activity and, as cells divide in culture, telomere erosion occurs. This particular cell type has the ability to proliferate beyond the Hayflick limit by spontaneously losing the p16^{INK4a} protein expression [17]. In cycling HMECs, telomeric repeats become progressively shorter and therefore the mechanisms underlying telomere-dependent genome instability can be dissected. The analysis of HMECs throughout the cell culture has shown that, in parallel to the increasing levels of telomere dysfunction, there was a significant rise in the frequency of ANMs. However, the different types of abnormalities did not increase by the same magnitude. NPBs and Bs increased significantly with PDs although the former did so to a greater extent than the latter. In contrast, no differences were observed in the frequency of MN throughout the cell culture. The dissimilarities outlined could be related to the types of chromosomal abnormalities generated in these cells. In HMECs, telomere-to-telomere fusions from two different chromosomes were the predominant type of chromosome aberrations [19]. As dicentric chromosomes did not originate through breakage but from telomere exhaustion they were not accompanied by acentric chromosome fragments. Accordingly, every NPB was not escorted by an MN, which explains why the level of MN remains almost stable throughout the cell culture. In conclusion, although the micronucleus assay has been extensively used for the study of chromosome damage resulting from clastogenic and aneugenic agents, scoring of the micronucleus in HMECs does not provide enough information on the chromosomal instability that these cells suffer in culture. In contrast, the use of NPB and B scoring in a telomere-dysfunction environment is of great value as it provides direct evidence of genome damage resulting from misrepaired DNA breaks.

Chromatin breakage has proved to be the major mechanism of resolution of anaphase bridges using real-time imaging [3,29,30]. In HMECs, chromatin breakage was also the main mechanism of resolution of anaphase bridges. The incidence of buds was far more frequent than that of micronuclei, suggesting that once a single break occurred on the chromatidic bridge, tension from the bipolar attachment was lost favouring the appearance of bilateral buds. This low level of MN formation is in agreement with recent observations of HeLa cells where broken anaphase bridges evolving into

MN occurred in only 12.66% of mitosis [31]. In contrast, in squamous carcinoma cells most bridges were broken, forming micronuclei in 70% of the cells [3]. This variability in the MN formation rate could reflect mechanistic differences in MN origin, depending on cell type. Therefore, we do not disregard the possibility that other mechanisms in HMECs, not only anaphase bridge breakage, could be the basis for the formation of MN. Alternative mechanisms for MN formation such as budding of amplified DNA sequences or whole chromosome losses have also been described [4]. In this sense, anaphase lagging appears to be a potential candidate for MN formation in HMECs as DNA amplification is not a common event in these cells. In summary, all these results indicate that the predominant fate of anaphase bridges in HMECs is breakage, resulting in the formation of nuclear buds and the consequent delivery of nontelomeric unprotected chromosome ends to each daughter cell.

The precise identification of the chromosome arms with critically short telomeres in these particular primary HMECs enabled an accurate evaluation of how telomere dysfunction can account for the appearance of ANMs. In these cells, the shortest telomeres were mainly located on the long arm of chromosome 1 but also on the short arm of chromosome 22. Consistent with this, telomere-telomere fusions of these particular chromosomes were nearly the only cytogenetic abnormality observed at metaphase at initial PD [19]. The use of centromeric and painting FISH probes specific for chromosomes with different telomere erosion profiles on these cells enabled us to determine a preferential involvement of chromosomes with critically short telomeres in ANMs. This is consistent with the presence of end-to-end chromosome fusions having mechanical difficulties during segregation if a twist between both centromeres occurs. Strikingly, although chromosomes 1 and 22 both presented critically short telomeres, chromosome 22 contributed less to the formation of NPBs than chromosome 1. These results suggest that additional factors other than telomere dysfunction modulate the participation of chromosomes in ANMs. In this sense, it can be concluded that chromosomal morphology appears to be a factor to be considered. When a dic (1q;22p) is formed, the long arm of chromosome 1 mainly contributes to the intercentromeric region between the two centromeres. After that, if a twist between both centromeres occurs, the resulting NPB will be derived mostly from chromosome 1. Consistent with this, chromosome 1 painting was observed in the majority of NPBs. As the bridges can theoretically break anywhere between both centromeres, the use of painting probes for chromosomes with eroded telomeres also confirmed the preference for the inclusion of chromosome 1 in Bs and in MN. Therefore, our results confirm previous conclusions in carcinoma cell lines [32]; that chromosomes with eroded telomeres are involved in abnormal nuclear morphologies more frequently than chromosomes of a normal telomere length. However, the architecture of the chromosomes also appears to be a factor that must be considered.

In summary, our results indicate that telomere-dysfunction dependent chromosomal instability is mediated mainly by the formation of NPBs and nuclear buds. This reflects the importance of these biomarkers over MN scoring for evaluating chromosome damage. We propose that most of the abnormal nuclear morphologies derive from end-to-end fusions affecting chromosomes with critically short telomeres. The tension generated by microtubules at kinetochores in a twisted dicentric leads to the formation of NPBs which break during anaphase creating nuclear buds in both daughter cells. In this cell system, MN arising from anaphase bridge breakage was low, thus indicating the existence of other sources of MN formation. Therefore, it would be of major interest to ascertain whether anaphase lagging is a common event in cells with dysfunctional telomeres.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgments

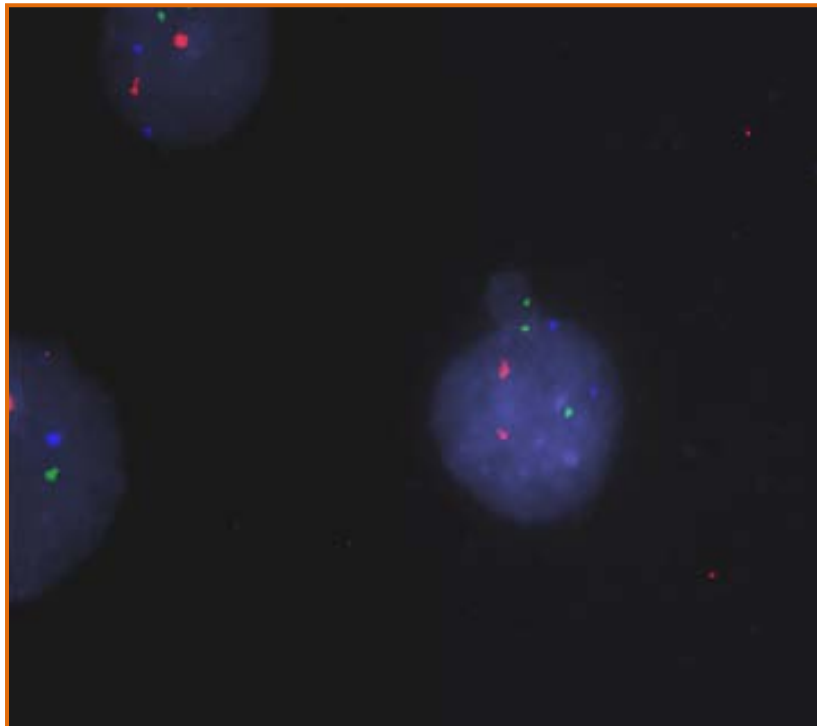
This work was supported by grants from: *Consejo de Seguridad Nuclear; Fundació la Marató*, Grant number TV32005-050110; *Ministerio de Educación y Ciencia*, Grant numbers SAF2004-20372-E and SAF2006-01653; *Instituto de Salud Carlos III*, Grant number RD06/0020/1020 and *Generalitat de Catalunya*, Grant number 2005SGR-00437. J. Pampalona received a grant from the *Generalitat de Catalunya* (2007FIC-00642). We thank O. Castell, M. Roldán and H. Montón from the *Servei de Microscòpia* for their advice about confocal microscopy and the Language Advisory & Translation Unit (SiMTRAD) at the *Universitat Autònoma de Barcelona* Language Service for editing the manuscript.

References

- [1] S. Kyrtopoulos, A. Sarrif, B. Elliott, B. Schoket, N. Demopoulos, Biomarkers and molecular epidemiology—present state and future trends: concluding remarks, *Mutat. Res.* 600 (2006) 77–78.
- [2] S. Bonassi, D. Ugolini, M. Kirsch-Volders, U. Strömberg, R. Vermeulen, J. Tucker, Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives, *Environ. Mol. Mutagen.* 45 (2005) 258–270.
- [3] D. Hoffelder, L. Luo, N. Burke, S. Watkins, S. Gollin, W. Saunders, Resolution of anaphase bridges in cancer cells, *Chromosoma* 112 (2004) 389–397.
- [4] N. Shimizu, N. Itoh, H. Utiyama, G. Wahl, Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase, *J. Cell Biol.* 140 (1998) 1307–1320.
- [5] D. Gisselsson, J. Björk, M. Höglund, F. Mertens, P. Dal Cin, M. Akerman, N. Mandahl, Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability, *Am. J. Pathol.* 158 (2001) 199–206.
- [6] B. McClintock, The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*, *Genetics* 26 (1941) 234–282.
- [7] M. Hande, E. Samper, P. Lansdorp, M. Blasco, Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice, *J. Cell Biol.* 144 (1999) 589–601.
- [8] T. de Lange, Protection of mammalian telomeres, *Oncogene* 21 (2002) 532–540.
- [9] R. DePinho, The age of cancer, *Nature* 408 (2000) 248–254.
- [10] S. Artandi, S. Chang, S. Lee, S. Alson, G. Gottlieb, L. Chin, R. DePinho, Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice, *Nature* 406 (2000) 641–645.
- [11] D. Gisselsson, T. Jonson, A. Petersén, B. Strömbeck, P. Dal Cin, M. Höglund, F. Mitelman, F. Mertens, N. Mandahl, Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 12683–12688.
- [12] B. Fouladi, L. Sabatier, D. Miller, G. Pottier, J. Murnane, The relationship between spontaneous telomere loss and chromosome instability in a human tumor cell line, *Neoplasia* 2 (2000) 540–554.
- [13] D. Gisselsson, Chromosome instability in cancer: how, when, and why? *Adv. Cancer Res.* 87 (2003) 1–29.
- [14] E. Montgomery, R. Wilentz, P. Argani, C. Fisher, R. Hruban, S. Kern, C. Lengauer, Analysis of anaphase figures in routine histologic sections distinguishes chromosomally unstable from chromosomally stable malignancies, *Cancer Biol. Ther.* 2 (2003) 248–252.
- [15] K. Rudolph, M. Millard, M. Bosenberg, R. DePinho, Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans, *Nat. Genet.* 28 (2001) 155–159.
- [16] K. Chin, C. de Solorzano, D. Knowles, A. Jones, W. Chou, E. Rodriguez, W. Kuo, B. Ljung, K. Chew, K. Myambo, M. Miranda, S. Krig, J. Garbe, M. Stampfer, P. Yaswen, J. Gray, S. Lockett, In situ analyses of genome instability in breast cancer, *Nat. Genet.* 36 (2004) 984–988.
- [17] A. Brenner, M. Stampfer, C. Aldaz, Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation, *Oncogene* 17 (1998) 199–205.
- [18] S. Romanov, B. Kozakiewicz, C. Holst, M. Stampfer, L. Haupt, T. Tlsty, Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes, *Nature* 409 (2001) 633–637.
- [19] D. Soler, A. Genescà, G. Arnedo, J. Egozcue, L. Tusell, Telomere dysfunction drives chromosomal instability in human mammary epithelial cells, *Genes Chromosomes Cancer* 44 (2005) 339–350.
- [20] L. Tusell, D. Soler, M. Agostini, J. Pampalona, A. Genescà, The number of dysfunctional telomeres in a cell: one amplifies: more than one translocate, *Cytogenet. Genome Res.* 122 (2008) 315–325.
- [21] I. Ponsa, J. Barquinero, R. Miró, J. Egozcue, A. Genescà, Non-disjunction and chromosome loss in gamma-irradiated human lymphocytes: a fluorescence in situ hybridization analysis using centromere-specific probes, *Radiat. Res.* 155 (2001) 424–431.
- [22] M. Martín, A. Genescà, L. Latre, M. Ribas, R. Miró, J. Egozcue, L. Tusell, Radiation-induced chromosome breaks in ataxia-telangiectasia cells remain open, *Int. J. Radiat. Biol.* 79 (2003) 203–210.
- [23] M. Fenech, The in vitro micronucleus technique, *Mutat. Res.* 455 (2000) 81–95.
- [24] P. Thomas, K. Umegaki, M. Fenech, Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutagenesis* 18 (2003) 187–194.
- [25] M. Hemann, M. Strong, L. Hao, C. Greider, The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability, *Cell* 107 (2001) 67–77.
- [26] S. Espejel, S. Franco, S. Rodríguez-Perales, S. Bouffler, J. Cigudosa, M. Blasco, Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres, *EMBO J.* 21 (2002) 2207–2219.
- [27] W. Deng, S. Tsao, X. Guan, J. Lucas, H. Si, C. Leung, P. Mak, L. Wang, A. Cheung, Distinct profiles of critically short telomeres are a key determinant of different chromosome aberrations in immortalized human cells: whole-genome evidence from multiple cell lines, *Oncogene* 23 (2004) 9090–9101.
- [28] M. Fenech, Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer, *Drug Discov. Today* 7 (2002) 1128–1137.
- [29] N. Shimizu, K. Shingaki, Y. Kaneko-Sasaguri, T. Hashizume, T. Kanda, When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation, *Exp. Cell Res.* 302 (2005) 233–243.
- [30] S. Titen, K. Golic, Telomere loss provokes multiple pathways to apoptosis and produces genomic instability in *Drosophila melanogaster*, *Genetics* 180 (2008) 1821–1832.
- [31] X. Rao, Y. Zhang, Q. Yi, H. Hou, B. Xu, L. Chu, Y. Huang, W. Zhang, M. Fenech, Q. Shi, Multiple origins of spontaneously arising micronuclei in HeLa cells: direct evidence from long-term live cell imaging, *Mutat. Res.* 646 (2008) 41–49.
- [32] Y. Stewénius, L. Gorunova, T. Jonson, N. Larsson, M. Höglund, N. Mandahl, F. Mertens, F. Mitelman, D. Gisselsson, Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 5541–5546.

Treball II

**Whole Chromosome Loss Is Promoted by
Telomere Dysfunction in Primary Cells**



Whole Chromosome Loss Is Promoted by Telomere Dysfunction in Primary Cells

Judit Pampalona, David Soler, Anna Genescà, and Laura Tusell*

Cell Biology Unit, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

Errors in chromosome segregation during mitosis result in aneuploidy, which in humans may play a role in the onset of neoplasia by changing gene dosage. Nearly all solid tumors exhibit genomic instability at the chromosomal level, showing both structural and numerical chromosome abnormalities. Chromosomal instability occurs early in the development of cancer and may represent an important step in the initiation and/or progression of the disease. Telomere integrity appears to be a critical element in the genesis of structural chromosome imbalances, but it is still not clear whether it can also generate numerical chromosome aberrations. We investigated the possible relationship between telomere shortening and aneuploidy formation in human mammary epithelial cells using the cytokinesis-block micronucleus assay combined with fluorescent DNA probes. In this cell system, uncapped chromosomes fuse with each other resulting in dicentric chromosomes, which are known to be a source of new structural chromosome rearrangements. Here, we show that in primary epithelial cells, the chromosomes with short telomeres are more frequently involved in missegregation events than chromosomes of normal telomere length. Whole chromosome aneuploidy occurs through both nondisjunction and anaphase lagging of dicentric chromatids, which suggests that pulling anaphase bridges toward opposite poles can generate the necessary force for detaching a chromosome from the microtubules of one or both spindle poles. Therefore, telomere-driven instability can promote not only the appearance of chromosomal rearrangements but also the appearance of numerical chromosome aberrations that could favor cell immortalization and the acquisition of a tumor phenotype. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Cancer is a complex disease in which cells with altered gene expression grow abnormally, invade other tissues, and disrupt their normal functions. A crucial early event in carcinogenesis is the induction of genomic instability, which enables an initiated cell to evolve into a cancer cell by achieving a greater proliferation capacity. Genome instability can take different forms. Inactivation of one or several genes in the DNA mismatch repair pathway leads to microsatellite instability (MIN). MIN cancers retain a normal complement of chromosomes and do not develop gross chromosomal aberrations. However, most solid tumors are unable to maintain chromosomal integrity and display a myriad of complex chromosomal aberrations that are neither always shared by cells of the same tumor nor linked to a particular tumor type. This chromosomal instability (CIN), which can be defined as the continuous formation of new structural and numerical chromosome aberrations, is one of the most frequent forms of instability in human cancers (Lengauer et al., 1998).

It is well established that one of the mechanisms for the genesis of structural chromosome abnormalities is telomere exhaustion. Telomeres are DNA–protein complexes that protect the

ends of chromosomes from end-to-end fusion. They have become key players in maintaining genomic integrity. Evidence is accumulating that the loss of the telomere capping function due to proliferation-dependent telomere erosion is a crucial event in initiating cancer (Artandi et al., 2000; Rudolph et al., 2001; Lo et al., 2002; O'Hagan et al., 2002; Londoño-Vallejo, 2008). The covalent fusion of chromosomes with eroded telomeres gives rise to dicentric or ring chromosomes that can initiate breakage-fusion-bridge (BFB) cycles when they are simultaneously pulled to opposite poles at anaphase. This may lead to extensive genome remodeling and scrambling, which is characteristic of carcinomas, and cause unbalanced translocations, which are the

Supported by: Consejo de Seguridad Nuclear; Fundació la Marató, Grant number: TV32005-050110; Ministerio de Educación y Ciencia, Grant number: SAF2006-01653; Instituto de Salud Carlos III, Grant number: RD06/0020/1020; Generalitat de Catalunya, Grant number: 2009SGR-282; Generalitat de Catalunya, Grant number: 2009FIC00063.

*Correspondence to: Laura Tusell, Cell Biology Unit, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, School of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain. E-mail: laura.tusell@uab.es

Received 8 September 2009; Accepted 14 December 2009

DOI 10.1002/gcc.20749

Published online 19 January 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

most common type of structural chromosome abnormality in carcinoma cells (Gisselsson, 2003; Gisselsson et al., 2001). Most tumors, as well as exhibiting structural chromosomal rearrangements, also show abnormal chromosome numbers. Aneuploidy is the most frequently identified genomic abnormality in cancer. It has been shown to occur early in progression and is often observed in premalignant lesions (Shih et al., 2001). Because of the loss or gain of entire chromosomes, aneuploidy could stimulate overexpression or the loss of specific loci relevant to cell growth and thus provide the conditions for more aggressively growing cells to be selected.

There are different theories on the mechanisms underlying the genesis of aneuploidy in relation to the cancer phenotype. Duesberg et al. postulated that carcinogens generate aneuploidy by chemically or physically altering one or more of the chromosomes or the proteins of the spindle apparatus (Duesberg et al., 2000; Li et al., 2000). Then, the asymmetric segregation of chromosomes destabilizes the karyotype. This would initiate an autocatalytic karyotype evolution that would generate the CIN that is characteristic of preneoplastic and finally cancer cells. However, in contrast to the opinion that aneuploidy is the primary cause of CIN, other theories suggest that telomere exhaustion is a possible origin not only of structural (Artandi et al., 2000) but also of numerical aberrations (Gisselsson and Höglund, 2005) that could be at the basis of neoplasia. The mechanical tension of bridged end-to-end chromosome fusions has been suggested to result in one or both chromatids detaching from the mitotic spindle, leading to whole chromosome aneuploidy (Stewénius et al., 2005). Studies that link aneuploidy to telomere dysfunction have been carried out on solid tumors and tumor-derived cell lines that have active telomerase, which appears to protect against genomic instability by stabilizing telomere ends. Under these circumstances, the telomere function can be restored and whole-chromosome losses are not readily associated with telomere dysfunction. Till now, studies carried out on transformed nonimmortal epithelial cells have failed to link telomere dysfunction with whole chromosome losses or gains (Velicescu et al., 2003; Deng et al., 2007).

In this study, we sought to better understand the relationship between telomere attrition and the generation of aneuploidy, as this could provide important insights into the mechanisms behind genetic instability in human cancers. We

took advantage of the fact that human mammary epithelial cells (HMECs) represent a clean model system in which mechanisms underlying telomere-dependent genome instability can be dissected. These cells do not show telomerase activity, and telomere shortening occurs when they are cultured in vitro. Continued proliferation of HMECs due to spontaneous inactivation of the CDKN2A gene leads cells to reach critically short telomeres. By losing their telomere-capping function, chromosomes with uncapped telomeres tend to fuse with each other to originate dicentric chromosomes. These unstable chromosome reorganizations can enter BFB cycles and generate massive CIN (Soler et al., 2005) before the culture terminates in a population growth plateau (Romanov et al., 2001). To determine whether there is a relationship between telomere shortening and aneuploidy, we applied the cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) in combination with pancentromeric and pantelomeric peptide nucleic acid (PNA) probes and DNA probes specific for the centromeric region of chromosomes with critically short telomeres. In summary, our results demonstrate that numerical chromosomal alterations accumulate with telomere erosion and that chromosomes with dysfunctional telomeres segregate erroneously more often than other chromosomes in primary human epithelial cells. These results provide evidence that a telomere-dependent mechanism is behind the development of aneuploidy during early carcinogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Cells and Culture Conditions

219-7 HMECs (BioWhittaker, Walkersville, MD) were derived from normal breast tissue. Cells obtained from the vendor at passage 6 (PD20) were cultured in serum-free MEGM medium with supplements (BioWhittaker). The cells were counted, plated at 2×10^5 cells per 75 cm² flask, and grown at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The number of accumulated population doublings (PDs) per passage was determined using the equation $PD = \text{initial PD} + \log(\text{no. of viable cells harvested}/\text{no. of viable cells plated})/\log 2$. The finite life span of primary HMECs when cultured in MEGM medium is about 18–20 passages, which is equivalent to approximately 50 PDs.

Cytokinesis-Block Micronucleus Assay and Metaphase Preparations

To obtain binucleated cells (BN-HMECs), cytokinesis was blocked by adding cytochalasin B (Cyt-B; Sigma, St. Louis, MO) at a final concentration of 6 µg/ml (Ponsa et al., 2001). The Cyt-B treatment was applied at PD25 and PD36, which represent an early and an advanced PD, respectively. As a control, Cyt-B nontreated mononucleated HMECs (MoN-HMECs) from PD36 were also obtained. After trypsinization, BN- and MoN-HMECs suspensions were centrifuged at 220g for 8 min, followed by hypotonic shock and three rounds of methanol/acetic fixation. Before the binucleated samples were dropped onto clean slides, they were properly diluted to avoid cells overlapping.

Metaphase spreads were also obtained at PD25 and PD36 by means of treatment with colcemid 0.02 µg/ml for 8 hr, followed by hypotonic shock and methanol/acetic fixation. Cell suspensions were dropped onto clean slides, which were stored at -20°C.

Fluorescence In Situ Hybridization

PNA-FISH

To identify the specific chromosome arms carrying critically short telomeres, PNA-fluorescence in situ hybridization (FISH) experiments were performed on metaphase chromosome slides from PD25 and PD36 using a Cy3-(CCCTAA)₃ PNA-probe for telomeres and an FITC-AAA-CACTCTTTTGTAGA probe for centromeres (PE Biosystems, Foster City, CA; Martín et al., 2003). After reverse DAPI staining (0.125 µg/ml in antifade solution), which results in a reproducible G band-like pattern, each chromosome pair was accurately identified and each signal-free chromosome arm was recorded. In this analysis, we pooled the results obtained in the two homologs of each chromosome because they could not be formally distinguished. Centromere and telomere PNA-FISH probes were also applied to BN-HMECs from PD25 and PD36 to distinguish micronuclei that contain acentric fragments from those with whole chromosomes and/or centric chromosome fragments.

Chromosome-specific centromeric FISH

FISH was performed on BN-HMECs from PD25 and PD36 as well as on MoN-HMECs from PD36. A mixture of three commercial

probes (Abbott, Abbot Park, IL) that detects the centromeric region of chromosomes 1 (CEP 1 Satellite II/III; *Spectrum Orange*) and 4 (CEP4; *Spectrum Aqua*) and the breakpoint cluster region (BCR) located close to the centromere of chromosome 22 (22q11.2) (LSI22; *Spectrum Green*) was applied to the slides. The resulting signals were red, light blue, and green for chromosomes 1, 4, and 22, respectively. Before hybridization, the slides were pretreated with pepsin (0.1 mg/ml; Sigma) in 10 mM HCl and postfixed in 37% formaldehyde in PBS/1 M MgCl₂. All probes were applied according to the manufacturer's instructions. Finally, slides were dehydrated and mounted in antifade solution containing DAPI.

Fluorescence signals were visualized under an Olympus BX microscope equipped with epifluorescent optics specific for each fluorochrome. Images were captured and analyzed using Cytovision software (Applied Imaging, San Jose, CA).

Scoring Criteria

A binucleated cell was scored when the distance between the two sister nuclei was equal or shorter than the radius of one nucleus. Moreover, the main nuclei could touch each other, but cells with overlapping nuclei were not considered. Finally, both sister nuclei must be approximately equal in size, with the same staining pattern and staining intensity.

After FISH with the centromeric specific probes, the distribution of fluorescent signals within nuclei and micronuclei in each binucleate was examined under a triple bandpass filter. The hybridization patterns allowed us to differentiate inherited aneuploidies (Fig. 1A) from those originated in the last nuclear division (Fig. 1B), and within the latter, nondisjunction from anaphase loss.

Statistical Analysis

All of the frequencies were calculated based on events that occurred. The nonparametric Mann-Whitney *U*-test was used to determine the differences between the frequencies observed in the two PD analyzed. All of the statistical analyses were performed using the SPSS14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) statistical package.

RESULTS

CIN in human cancers is manifested by the presence of abnormalities that affect both the

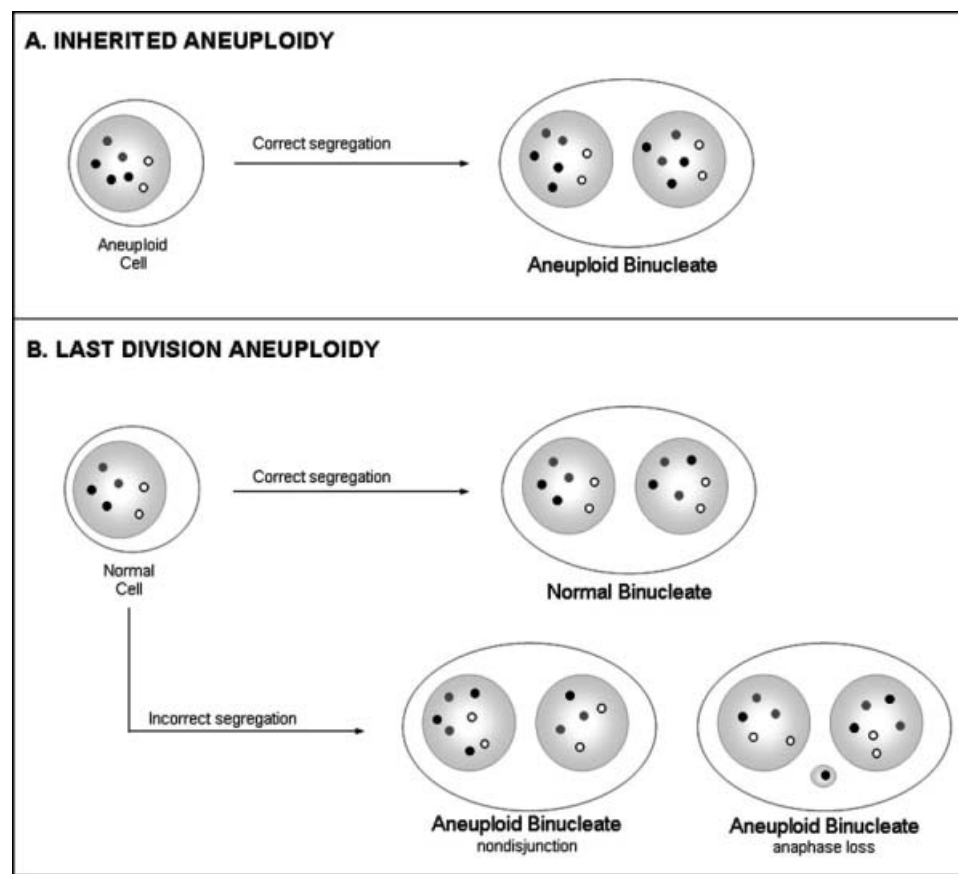


Figure 1. Different types of aneuploidy can be detected by combining in situ hybridization with centromeric probes and the CBMN assay. (A) Inherited aneuploidy originates when an aneuploid cell divides and both sister nuclei show the same aneuploid segregation pattern of centromeric signals. (B) Last division aneuploidy occurs when errors in chromosome segregation result in the unequal distri-

bution of centromeric signals between sister nuclei. Nondisjunction is observed when a chromosome moves from one nucleus to its sister nucleus, while in anaphase loss the lagging chromosome is included in a micronucleus. Nevertheless, this methodology only allows the segregation pattern of the tested chromosomes to be evaluated.

structure and the number of chromosomes. Although different studies have evidenced that dysfunctional telomeres are at the basis of structural chromosome aberrations (Deng et al., 2003, 2004; der-Sarkissian et al., 2004; Plug-DeMaggio et al., 2004; Soler et al., 2005; Tusell et al., 2008) and chromosomal segment imbalances (Deng et al., 2007), it is still unclear whether telomere dysfunction underlies the appearance of aneuploid genomes in human epithelial cells.

Impairment of Chromosome Migration Increases with Telomere Dysfunction

Over the past few years, the CBMN assay has evolved into a robust technique for detecting clastogenic and/or aneugenic agents. The delayed movement during anaphase of whole chromosomes or chromosome fragments results in lagging chromatin, which can form a micronucleus

in the next interphase. To explore the relationship between telomere length and anaphase lagging in human cells, we serially passaged HMECs to obtain cells with different telomere lengths due to proliferative-dependent telomere attrition. Chromosome migration defects were detected by combining the CBMN assay with FISH using a human pancentromeric PNA probe. In this assay system, positively labeled MN that contain whole chromosomes or centric fragments can be discriminated from nonlabeled MN containing acentric chromosome fragments.

The frequency of MN in Cyt-B treated BN-HMECs was obtained by analyzing 547 binucleated cells at PD25 and PD426 binucleates at PD36. At these PDs, the mean numbers of chromosome ends with undetectable TTAGGG signals per metaphase were 1.9 (204 free-signal ends in 108 metaphases) and 3.5 (322 free-signal ends in 91 metaphases), respectively. The

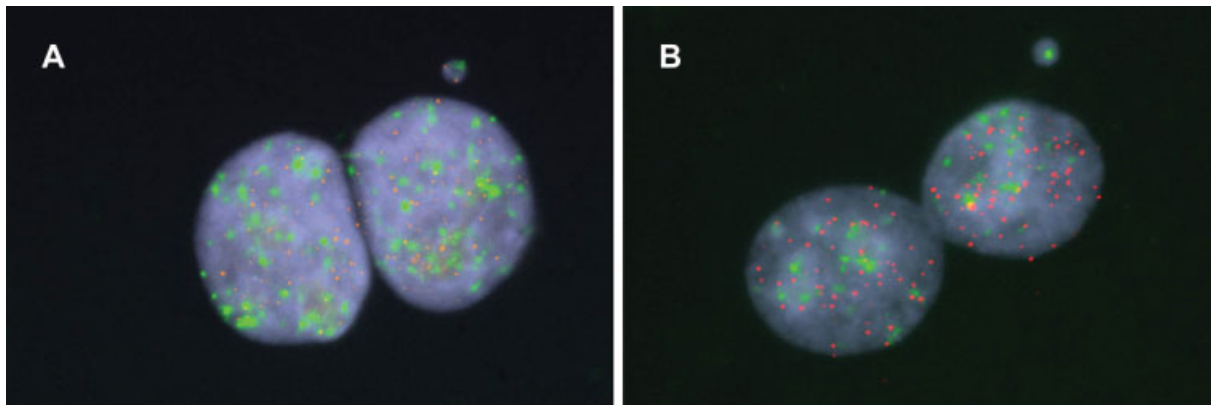


Figure 2. Binucleated HMECs hybridized with a pancentromeric (green) and a pantelomeric (red) PNA probe. Each binucleated cell has a micronucleus in addition to the two sister cell nuclei. (A) The micronucleus shows centromeric and telomeric hybridization signals. A whole chromosome or chromatid is expected to be included inside the MN. (B) The micronucleus contains only centromeric signals; therefore, it may contain a centric chromosome/chromatid fragment.

presence of chromosome ends with undetectable TTAGGG hybridization signals has been shown to be a good indicator of critically short and probably dysfunctional telomeres (Hemann et al., 2001; Espejel et al., 2002; Deng et al., 2004; Soler et al., 2005). A moderate increase in the total frequency of MN per binucleate was observed with increasing telomere dysfunction: at PD25, 0.0146 MN per binucleate were observed, whereas at PD36, the frequency increased to 0.0305 MN/binucleate (Mann-Whitney *U*-test, $P = 0.091$). However, a significant increase was observed when only the frequency of centromeric positive MN was considered. In the early PD, MN-containing centromeric signals accounted for 14.28% of all MN. In contrast, at PD36, nearly half of the MN showed hybridization with the pancentromeric PNA probe (Fig. 2). Overall, the incidence of anaphase lagging increased by a factor of 7.8 from the initial to the advanced PD (Mann-Whitney *U*-test, $P = 0.025$). These results indicate that chromosome loss due to defects in their attachment to the spindle apparatus or in their movement relative to the poles becomes more frequent as telomere dysfunction increases in HMECs.

Preferred Involvement of Chromosomes with Eroded Telomeres in Aneuploid Segregations

Studies using FISH with telomeric probes have demonstrated that individual telomere lengths in normal somatic cells are heterogeneous and vary between donors (Lansdorpe et al., 1996; Soler et al., 2005). To determine whether the telomere

length of an individual chromosome has any influence on its probability of missegregating, the distribution of specific chromosomes with critically short telomeres was analyzed in BN-HMECs using centromeric-specific DNA probes. Particular chromosomes with eroded telomeres were selected based on telomeric PNA-FISH metaphase analysis. It has been determined that the resolution of PNA-FISH methodologies on metaphase chromosomes is about 1,000 bp of TTAGGG repeats (Poon et al., 1999) and that a functional telomere should be greater than 76 bp in length (Capper et al., 2007). Accordingly, chromosome 4 was selected as having a noncritical telomere length, as the p- and q-arms showed PNA telomere signals in 96% of the metaphases analyzed (Fig. 3) and thus reflected a telomere repeat track greater than 1,000 bp. Chromosome 1 and chromosome 22 were chosen as chromosomes with critically short telomeres as one of the 1q-arm and one of the 22p-arm homologs lacked telomere signals in up to 54% and 48% of the metaphases in this donor (Fig. 3).

Centromeric probes for chromosomes 1 and 22 (CEP1 and LSI22) with short telomeres and for chromosome 4 (CEP4) with a noncritical telomere length profile were applied to BN-HMECs at PD25 and PD36. A total of 3,322 binucleates was analyzed to detect whole chromosome aneuploidy. At PD25, the total frequency of aneuploid cells for the three chromosomes analyzed was 0.035 per binucleate (Fig. 4). The presence of aneuploid segregations increased significantly with cell passage. At PD36, with increased telomere dysfunction, the incidence of aneuploidy

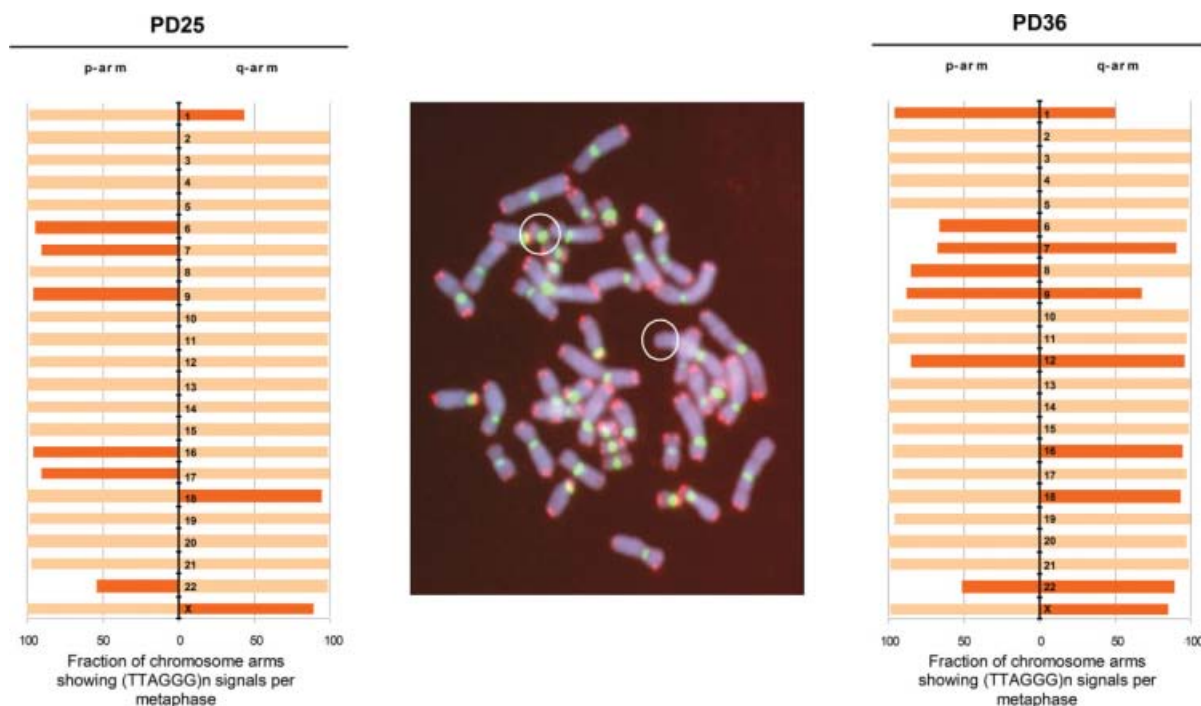


Figure 3. Distribution of (TTAGGG) n telomeric FISH signals among chromosome arms of HMECs at PD25 and PD36. A metaphase chromosome plate hybridized with a pantelomeric and pancentromeric PNA-probe shows a preferential absence of telomeric signals at the long arm of one chromosome 1 and at the short arm of one chromosome 22 (open circles).

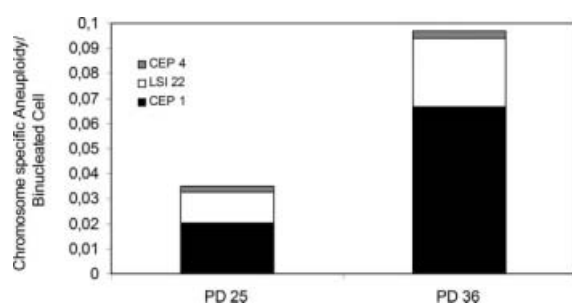


Figure 4. Telomere-related aneuploidy throughout the HMEC culture. Involvement of chromosomes with eroded telomeres (CEP1 and LSI22) and the chromosome with a normal telomere-length profile (CEP4) among aneuploid events per binucleate at PD25 and PD36.

was 2.8-fold higher and accounted for 0.097 events/binucleate (Mann-Whitney U -test, $P < 0.05$). When aneuploidy per chromosome was considered, we found that the chromosomes with eroded telomeres missegregated with a higher frequency than the chromosomes with a noncritical telomere length. Chromosome 1 and chromosome 22 together accounted for 95.5% of all detectable aneusomic events, while chromosome 4 only accounted for 4.5% (Figs. 4 and 5). These results point to a connection between telomere erosion and segregation errors during cell division. The analysis of the three selected chromo-

somes in Cyt-B nontreated MoN-HMECs gave additional evidence of the link between aneuploidy and telomere dysfunction. Similarly to the results for Cyt-B binucleates, in MoN-HMECs, aneusomies also preferentially affected the chromosomes with eroded telomeres (Table 1 and Fig. 5). Thus, we can rule out the possibility that the Cyt-B treatment has a contributing effect on chromosome missegregation in BN-HMECs. Taken together, these findings imply that telomere dysfunction plays a significant role in the genesis of numerical chromosome aberrations in HMECs.

Missegregation of Chromosomes with Eroded Telomeres Arises from Both Nondisjunction and Anaphase Loss

The analysis of segregation errors that took place during the last nuclear division in BN-HMECs allowed us to determine the mechanism by which aneuploidy was originated in these cells, i.e., nondisjunction or anaphase loss (Fig. 1B). The distribution of the three targeted chromosomes (#1, #4, and #22) between sister nuclei and micronuclei in BN-HMECs at PD25 and PD36 (Tables 2 and 3) demonstrated a significant

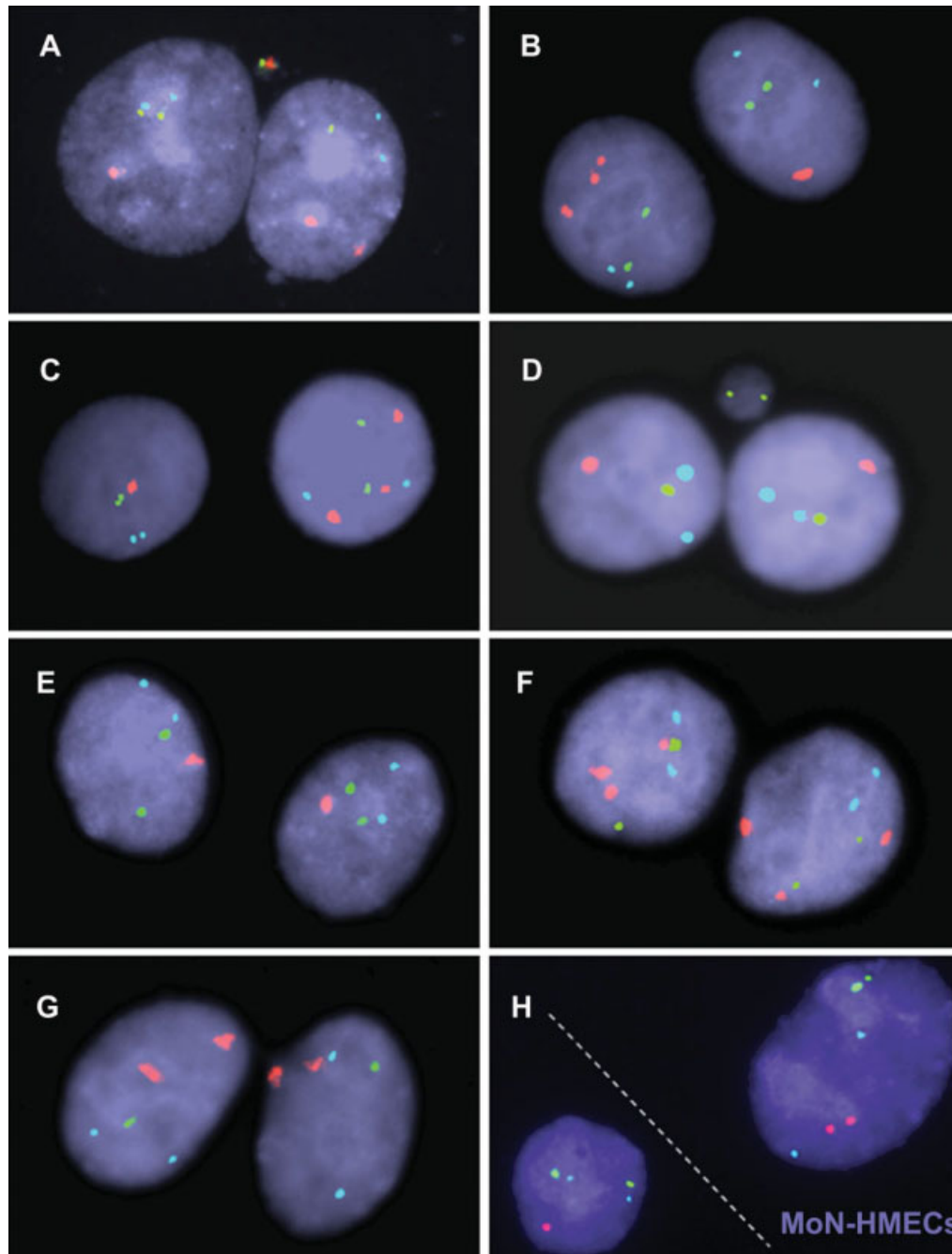


Figure 5. Images showing different missegregation patterns of selected chromosomes in HMECs. The centromeric probes are red for chromosome 1, blue for chromosome 4, and green for chromosome 22 (LSI probe). (A) Binucleated HMEC with a micronucleus showing centromeric CEPI and LSI signals. Note that each nucleus is aneuploid for one of the chromosomes included in the micronucleus. (B and C) Images of binucleated HMECs showing a nondisjunction of chromosome 1. For each binucleate, a monosomic and a trisomic nucleus for chromosome 1 can be seen. (D) Binucleated HMEC with a micronucleus showing two centromeric LSI signals. Accordingly, each

sister nucleus is monosomic for chromosome 22. In addition, this binucleated HMEC is monosomic for chromosome 1 (inherited aneuploidy). (E, F, and G) Different images of inherited aneuploidy in HMECs: a monosomic binucleate for chromosome 1, a trisomic binucleate for chromosome 1, and a monosomic binucleate for chromosome 22, respectively. (H) Two mononucleated HMECs hybridized with the same centromeric DNA probes. The nucleus on the right side is euploid, and thus shows two hybridization signals for each chromosome. The aneuploid nucleus on the left side is monosomic for chromosome 1.

increase in both chromosome losses and nondisjunction events with cell passage (Mann-Whitney *U*-test, $P < 0.05$). Nevertheless, there was a sig-

nificant prevalence of segregation errors due to nondisjunction over anaphase loss. In BN-HMECs, chromosomes with eroded telomeres

77

TABLE 1. Aneuploidy for Chromosomes 1, 4, and 22 in Binucleated (BN) and Mononucleated (MoN) HMECs at PD25 and PD36







Type of cells	PD	N. Cells	Aneuploidy per chromosome				Total (frequency)
			1	1 and 22	22	4	
BN	25	1143	15	0	9	2	26 (0.002)
BN	36	2179	94	0	41	5	140 (0.064)
MoN	36	1956	98	4	27	12	141 (0.072)

TABLE 2. Last Division Aneuploidy: Nondisjunction Events of Selected Chromosomes in HMEC Binucleates (BN)

PD	BN cells	Aneuploid cells (%)	3/1 signal distribution		
			1	4	22
25	1,143	10 ^a (0.87)	5 + 1 ^a	1	3 + 1 ^a
36	2,179	57 (2.62)	44	0	13
	3,322	67	50 (1.50%)	1 (0.03%)	17 (0.51%)

^aOne BN showed nondisjunction of both chromosomes 1 and 22.

TABLE 3. Last Division Aneuploidy: Distribution of Chromosomes 1 (Red), 4 (Blue), and 22 (Green) in Micronuclei (MN) of Binucleated (BN) HMECs

PD	BN cells	N. MN (frequency)	Distribution of centromeric probes among MN						Total lagging events (frequency)
									
25	1143	2 (0.0017)	1	0	1	0	0	0	3 (0.0026)
36	2179	11 (0.0050)	4	1	1	3	1	1	14 (0.0064)

segregated erroneously between sister nuclei and were included more frequently inside MN than those with a noncritical telomere length (98.5% and 94.1%, respectively; Fig. 5). Moreover, the specific distribution of centromeric signals in nuclei and micronuclei allowed the possible rearrangements that can lead to missegregation to be identified. In BN-HMECs, most nondisjunction events only affected one of the two tested chromosomes, and only one binucleate showed nondisjunction for both #1 and #22 (Table 2 and Fig. 5). This result implies that the two sister chromatids of an interchromosome dicentric that bridges at anaphase may have different fates: one dicentric chromatid usually breaks while the other missegregates between sister nuclei. However, around 40% of MN contained two centromeric signals either for the same chromosome or for different ones. This finding suggests that the formation of these MN is triggered by either lagging chromosomes with fused chromatids or twisted dicentric chromatids, respectively (Table 3). Overall, our study demonstrates that telomere shortening is linked to both chromosome lagging

at anaphase and to nondisjunctional events between sister nuclei.

DISCUSSION

Alterations in the number of intact chromosomes, which is known as whole chromosome aneuploidy, can be observed when errors in cell division occur. Unlike point mutations, which only affect a handful of genes, whole scale changes in chromosome number dramatically alter the landscape of gene expression. This can potentially be involved in the onset and progression of neoplasia. Indeed, aneuploidy is the most frequently identified genomic abnormality in cancer. It has been shown to occur early in cancer development and is often observed in premalignant lesions (Shih et al., 2001). A large body of evidence from studies with mice supports the notion that telomere shortening in proliferating tissues together with cell cycle checkpoint aberrations can harbor epithelial carcinogenesis. Different studies in epithelial cells have shown that chromosomes with eroded telomeres are those

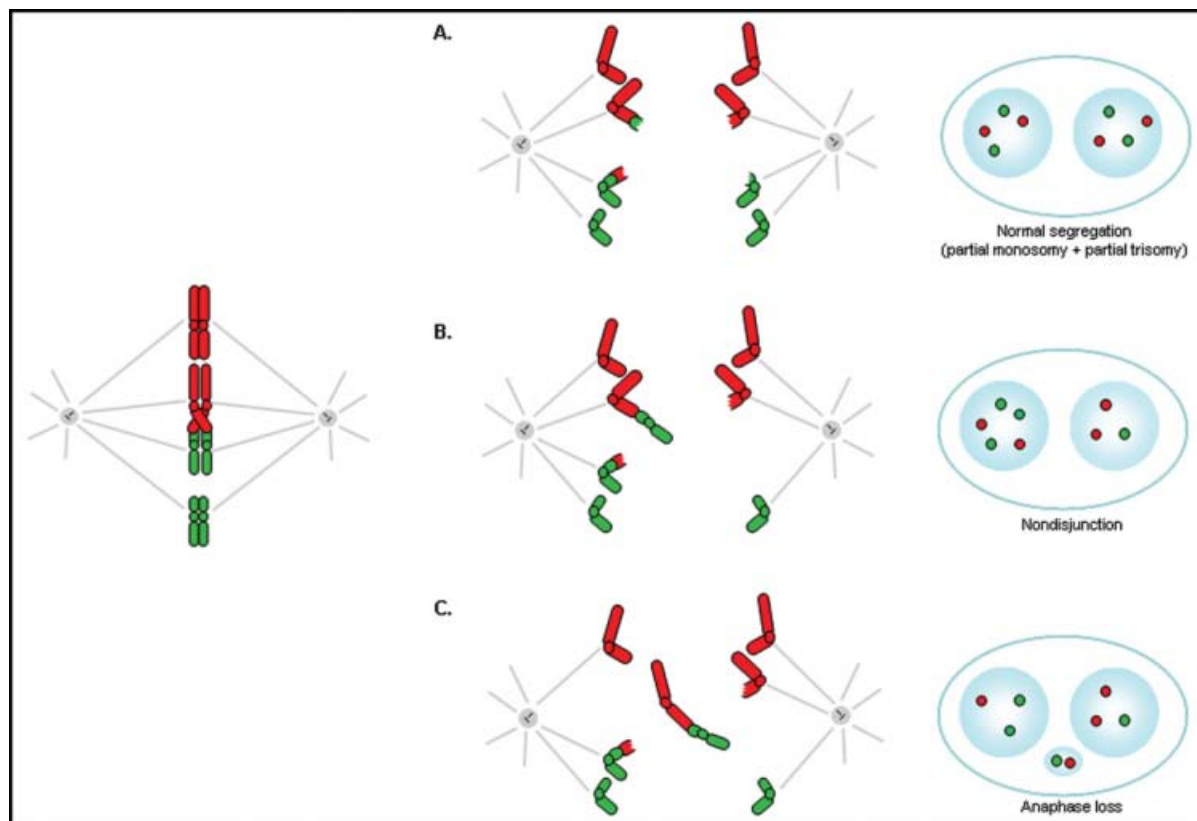


Figure 6. Diagram showing possible segregation behaviors of end-to-end chromosome fusions. When the intercentromeric region of a dicentric chromosome twists, the chromatid bridge which is formed can break (A) resulting in partial monosomies and trisomies in the daughter cells, but there is a normal pattern of centromeric signals in interphase binucleated nuclei. When the dicentric chromatid is only released from one pole, the tension exerted by the microtubules of the opposite pole engenders a nondisjunction (B). In this case, one of

the daughter cells will receive a whole chromosome and the other will lose one. However, the aneuploid event can be complete or incomplete depending on whether the second dicentric chromatid breaks. (C) Finally, if the dicentric chromatid frees itself from the microtubules of both spindle poles, it remains in the equator of the cell, while all other chromosomes move toward the poles. The ultimate decondensation of chromatin of the anaphase-lagged chromosome will originate a micronucleus.

most frequently involved in structural chromosome aberrations (Deng et al., 2003, 2004; der-Sarkissian et al., 2004; Plug-DeMaggio et al., 2004; Soler et al., 2005) and in chromosomal segment imbalances in human cells (Deng et al., 2007; Tusell et al., 2008). However, till now, it has not been reported that losses or gains of entire chromosomes with critically short telomeres are significantly more frequent or consistent when compared with other chromosomes in noncancerous epithelial cells (Deng et al., 2007).

Our results with HMECs clearly demonstrate a connection between telomere dysfunction and numerical chromosome aberrations. The underlying causes behind aneuploidy acquired through telomere dysfunctionality could be related to the formation of end-to-end chromosome fusions. If a twist in the intercentromeric region of a dicentric chromosome occurs, the two kinetochores on each dicentric chromatid will be directed toward

opposite poles and a chromatid bridge will be formed at anaphase. In HMECs, the frequency of anaphase bridges statistically increased with cell passage (Pampalona et al., 2010). Studies using real-time imaging have revealed how these chromatin structures can be resolved during cell division. Chromatin breakage has been observed as the main mode of anaphase bridge resolution in different cell types (Hoffelder et al., 2004; Shimizu et al., 2005; Titen and Golic, 2008), and it has also been found to be the main mechanism of anaphase bridge resolution in HMECs (Pampalona et al., 2010). This observation is consistent with a prevalence of chromosomes with shortened telomeres in structural chromosome aberrations and segment imbalances (Fig. 6; Soler et al., 2005). However, whole chromosome losses and gains cannot result after bridge breakage at anaphase. Mis-segregation of chromosomes after the resolution of chromatin bridging at anaphase can

only be explained if the dicentric chromatids detach from the microtubules of only one spindle pole, resulting in nondisjunction, or instead they detach from both spindle poles, causing chromosome loss (Fig. 6). These assumptions have been associated with the appearance of aneuploid genomes in colon cancer cell lines (Stewénius et al., 2005).

In HMECs, the enumeration of approximately 3,300 binucleates and nearly 2,000 mononucleates with centromeric specific probes demonstrated that chromosomes with shortened telomeres were preferentially involved in aneuploid segregations. These results clearly point to a connection between mechanical problems of end-to-end chromosome fusions at anaphase and their missegregation. Moreover, the specific arrangement of centromeric signals among sister nuclei and micronuclei allowed us to determine the main mechanism of aneuploidy formation in these cells. Theoretically, the same number of hypoploid and hyperploid nuclei is expected if nondisjunction of dicentric chromatids is the sole mechanism that contributes to the formation of aneuploid nuclei; however, if anaphase lagging also occurs, the equilibrium between losses and gains originated by nondisjunction becomes unbalanced, thus resulting in a higher number of hypoploid cell nuclei. The analysis of BN-HMECs revealed that the prevalent mechanism leading to aneuploidy was nondisjunction (ratio hyperploid:hypoploid around 1:1). However, when MoN-HMECs were analyzed, more chromosome losses than gains were observed (ratio hyperploid:hypoploid of 1:2.3). These differences could in part be related to the short distance between the spindle poles in the Cyt-B-treated BN-HMECs, which may increase the likelihood of nondisjunction events in binucleates due to lagging chromosomes being engulfed in one of the main nuclei (Cimini et al., 1999). However, more importantly, when nondisjunction of a dicentric chromatid occurs, the addition of extra chromosomes in one nucleus does not necessarily result in the appearance of a trisomic clone of cells because the extra chromosome is part of a dicentric chromosome that can reorganize further. Nevertheless, a real monosomy in the sister nucleus is produced, which by division will originate a hypoploid clone of cells. Therefore, as cells proliferate there will be a higher proportion of hypoploid when compared with hyperploid MoN-HMECs. Consistent with these results, studies on ulcerative colitis have found a strong correla-

tion between telomere shortening and losses of both chromosome arms and centromeres, while no correlation has been observed for gains (O'Sullivan et al., 2002). Similar results were observed for cultured lymphocytes of healthy older women (Leach et al., 2004), which provides evidence that the loss of chromosomes at anaphase and their subsequent inclusion in MN is the stemming mechanism for telomere-related aneuploidy. It is noteworthy that in HMECs, a gain in one nucleus is balanced by the loss of the same chromosome in the sister nucleus, which implies that a whole chromosome moves and not a chromosome fragment. In summary, the emerging picture for HMECs is that the tension generated at anaphase in twisted end-to-end fused chromosomes with eroded telomeres can lead to whole chromosome missegregation.

In conclusion, the appearance of numerical aberrations in this cellular model follows telomere attrition, which implies that shortening of telomeres plays a significant role in the genesis of aneuploidy. From our results, we can conclude that telomere erosion destabilizes the cell karyotype due to different events that occur sequentially: the exhaustion of telomeric DNA repeats is followed by the formation of end-to-end fusions, and then by partial and/or whole chromosome gains and losses. These results show a common origin for regional chromosome number imbalances and whole chromosome missegregation events, which are hallmarks of cancer cells.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Language Advisory and Translation Unit (SiMTRAD) at the *Universitat Autònoma de Barcelona* Language Service for editing this manuscript.

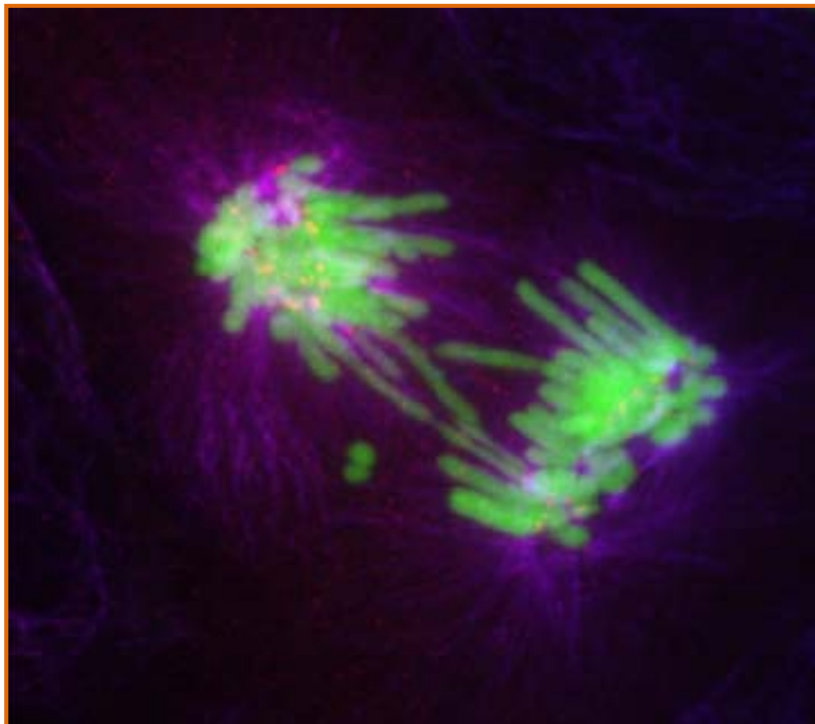
REFERENCES

- Artandi S, Chang S, Lee S, Alson S, Gottlieb G, Chin L, DePinho R. 2000. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 406:641–645.
- Capper R, Britt-Compton B, Tankimanova M, Rowson J, Letsolo B, Man S, Haughton M, Baird DM. 2007. The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells. *Genes Dev* 21:2495–2508.
- Cimini D, Tanzarella C, Degrossi F. 1999. Differences in malsegregation rates obtained by scoring ana-telophases or binucleate cells. *Mutagenesis* 14:563–568.
- Deng W, Tsao S, Guan X, Lucas J, Cheung A. 2003. Role of short telomeres in inducing preferential chromosomal aberrations in human ovarian surface epithelial cells: A combined telomere quantitative fluorescence in situ hybridization and whole-chromosome painting study. *Genes Chromosomes Cancer* 37:92–97.
- Deng W, Tsao S, Guan X, Lucas J, Si H, Leung C, Mak P, Wang L, Cheung A. 2004. Distinct profiles of critically short telomeres are a key determinant of different chromosome aberrations in

- immortalized human cells: Whole-genome evidence from multiple cell lines. *Oncogene* 23:9090–9101.
- Deng W, Tsao S, Guan X, Cheung A. 2007. Microtubule breakage is not a major mechanism for resolving end-to-end chromosome fusions generated by telomere dysfunction during the early process of immortalization. *Chromosoma* 116:557–568.
- der-Sarkissian H, Bacchetti S, Cazes L, Londoño-Vallejo J. 2004. The shortest telomeres drive karyotype evolution in transformed cells. *Oncogene* 23:1221–1228.
- Duesberg P, Li R, Rasnick D, Rausch C, Willer A, Kraemer A, Yerganian G, Hehlmann R. 2000. Aneuploidy precedes and segregates with chemical carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 119:83–93.
- Espejel S, Franco S, Rodríguez-Perales S, Bouffler S, Cigudosa J, Blasco M. 2002. Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *EMBO J* 21:2207–2219.
- Gisselsson D. 2003. Chromosome instability in cancer: How, when, and why? *Adv Cancer Res* 87:1–29.
- Gisselsson D, Höglund M. 2005. Connecting mitotic instability and chromosome aberrations in cancer—Can telomeres bridge the gap? *Semin Cancer Biol* 15:13–23.
- Gisselsson D, Jonson T, Petersén A, Strömbeck B, Dal Cin P, Höglund M, Mitelman F, Mertens F, Mandahl N. 2001. Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12683–12688.
- Hemann M, Strong M, Hao L, Greider C. 2001. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 107:67–77.
- Hoffelder D, Luo L, Burke N, Watkins S, Gollin S, Saunders W. 2004. Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma* 112:389–397.
- Lansdorp P, Verwoerd N, van de Rijke F, Dragowska V, Little M, Dirks R, Raap A, Tanke H. 1996. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 5:685–691.
- Leach N, Rehder C, Jensen K, Holt S, Jackson-Cook C. 2004. Human chromosomes with shorter telomeres and large heterochromatin regions have a higher frequency of acquired somatic cell aneuploidy. *Mech Ageing Dev* 125:563–573.
- Lengauer C, Kinzler K, Vogelstein B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643–649.
- Li R, Sonik A, Stindl R, Rasnick D, Duesberg P. 2000. Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: Recent study claims mutation but is found to support aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3236–3241.
- Lo A, Sabatier L, Fouladi B, Pottier G, Ricoul M, Murnane J. 2002. DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line. *Neoplasia* 4:531–538.
- Londoño-Vallejo J. 2008. Telomere instability and cancer. *Biochimie* 90:73–82.
- Martín M, Genescà A, Latre L, Ribas M, Miró R, Egozcue J, Tusell L. 2003. Radiation-induced chromosome breaks in ataxia-telangiectasia cells remain open. *Int J Radiat Biol* 79:203–210.
- O'Hagan R, Chang S, Maser R, Mohan R, Artandi S, Chin L, DePinho R. 2002. Telomere dysfunction provokes regional amplification and deletion in cancer genomes. *Cancer Cell* 2:149–155.
- O'Sullivan J, Bronner M, Brentnall T, Finley J, Shen W, Emerson S, Emond M, Gollahon K, Moskovitz A, Crispin D, Potter JD, Rabinovitch PS. 2002. Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. *Nat Genet* 32:280–284.
- Pampalona J, Soler D, Genescà A, Tusell L. 2010. Telomere dysfunction and chromosome structure modulate the contribution of individual chromosomes in abnormal nuclear morphologies. *Mutat Res* 683:16–22.
- Plug-DeMaggio A, Sundsvold T, Wurscher M, Koop J, Klingelhutz A, McDougall J. 2004. Telomere erosion and chromosomal instability in cells expressing the HPV oncogene 16E6. *Oncogene* 23:3561–3571.
- Ponsa I, Barquinero J, Miró R, Egozcue J, Genescà A. 2001. Non-disjunction and chromosome loss in gamma-irradiated human lymphocytes: A fluorescence in situ hybridization analysis using centromere-specific probes. *Radiat Res* 155:424–431.
- Poon SS, Martens UM, Ward RK, Lansdorp PM. 1999. Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 36:267–278.
- Romanov S, Kozakiewicz B, Holst C, Stampfer M, Haupt L, Tlsty T. 2001. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature* 409:633–637.
- Rudolph K, Millard M, Bosenberg M, DePinho R. 2001. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat Genet* 28:155–159.
- Shih I, Zhou W, Goodman S, Lengauer C, Kinzler K, Vogelstein B. 2001. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 61:818–822.
- Shimizu N, Shingaki K, Kaneko-Sasaguri Y, Hashizume T, Kanda T. 2005. When, where and how the bridge breaks: Anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Exp Cell Res* 302:233–243.
- Soler D, Genescà A, Arnedo G, Egozcue J, Tusell L. 2005. Telomere dysfunction drives chromosomal instability in human mammary epithelial cells. *Genes Chromosomes Cancer* 44:339–350.
- Stewenius Y, Gorunova L, Jonson T, Larsson N, Höglund M, Mandahl N, Mertens F, Mitelman F, Gisselsson D. 2005. Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5541–5546.
- Titen S, Golic K. 2008. Telomere loss provokes multiple pathways to apoptosis and produces genomic instability in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 180:1821–1832.
- Tusell L, Soler D, Agostini M, Pampalona J, Genescà A. 2008. The number of dysfunctional telomeres in a cell: One amplifies; more than one translocate. *Cytogenet Genome Res* 122:315–325.
- Velicescu M, Yu J, Herbert B, Shay J, Granada E, Dubeau L. 2003. Aneuploidy and telomere attrition are independent determinants of crisis in SV40-transformed epithelial cells. *Cancer Res* 63:5813–5820.

Treball III

**Abnormal Kinetochores Microtubule Dynamics
Causes Aneuploid Segregation of Anaphase
Bridges *(en preparació)***



Abnormal kinetochore microtubule dynamics causes aneuploid segregation of anaphase bridges

Judit Pampalona^{1,2}, William T. Silkworth¹, Anna Genesca², Laura Tusell² and Daniela Cimini^{1*}

¹ Virginia Polytechnic Institute and State University, Department of Biological Sciences, 1981 Kraft Dr., Blacksburg, VA 24060 – USA

² Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, E-08193, Spain

*Corresponding author cimini@vt.edu

Introduction

Most solid tumors contain reorganized genomes with partial as well as whole chromosome aneuploidies (Mitelman Database). These complex karyotypes do not emerge as a result of basal mutation rates but rather as a consequence of a deregulated mechanism which causes genome instability (Lengauer et al., 1998). This instability could lead to tumour development allowing cells to acquire the mutations that favor cell proliferation and survival. The most widespread type of genome instability among tumors is chromosome instability (CIN), which consists in the continuous gain or loss of whole chromosomes (W-CIN) or chromosome segments (S-CIN).

A common source of CIN in solid tumors is the presence of anaphase bridges connecting the two bulks of segregating chromatin. These aberrant configurations, typically observed during anaphase-telophase, are usually originated by dicentric and/or ring chromosomes. These aberrant chromosomes appear when telomere dysfunction occurs. Telomeres, at the very end of chromosomes, are formed by DNA repeats of TTAGGG and specialized proteins that form a telomeric loop (Griffith et al., 1999). Telomeres become dysfunctional when they lose the loop structure as a consequence of insufficient telomeric DNA repeats or the absence of functional telomeric proteins (Capper et al., 2007). In both cases, uncapped telomeres are recognized as double stranded breaks (DSBs) by the DNA repair cell machinery (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Takai et al., 2003) and may be fused to each other which leads to unstable rearrangements such as end-to-end chromosome fusions

(dicentric chromosomes) or sister chromatid fusions. These types of chromosome rearrangements can also be generated through exposure to DNA DSB-inducing agents. These agents introduce random DNA DSBs that can be illegitimately repaired to form dicentric chromosomes, which can enter into the so-called breakage-fusion-bridge cycles (BFB) that constitute the basis for S-CIN.

Dicentric chromosomes may encounter segregation problems at anaphase if they are positioned with a twist along their intercentromeric region in the metaphase plate. Then, each kinetochore within the same dicentric chromatid is simultaneously pulled by microtubule bundles emanating from opposite poles. During anaphase, this leads to the formation of a chromatin bridge that connects the two segregating complements. The intervening chromatin will eventually break, creating new truncated chromosome ends that can be fused again and re-enter into the BFB-cycle. Although bridge breakage appears to be their main fate, other outcomes are also possible. Several studies on the resolution of anaphase bridges that used real time microscopy on living cells showed that bridges do not always break (Hoffelder et al., 2004; Steigemann et al., 2009). Moreover, telomere dysfunction has been related to both chromosome breakage and whole chromosome aneuploidy (Pampalona et al., 2010b). It has been suggested that anaphase bridges break as a consequence of the tension forces generated by microtubules (MT) when they depolymerize towards the respective poles (Shimizu et al., 2005), while aneuploidy occurs due to mechanical detachment of the bridged

chromatin from the mitotic spindle machinery (Stewenius et al., 2005). Therefore, it seems that microtubule-kinetochore attachments (MT-KT) may play a role in determining the fate of the anaphase bridge.

In order to investigate the behavior and fate of chromatin bridges, we performed experiments in two different contexts, both of which allowed us to detect a large number of bridges. In one set of experiments, we used human mammary epithelial cells (HMECs). These cells exhibit a high degree of telomere dysfunction (Romanov, 2001), which results in high frequencies of chromatin bridges. A second set of experiments was performed with Ptk1 cells treated with bleomycin, which induces DNA DSBs; thus, chromatin bridges appear at the following mitosis. We observed that bridges hardly ever lose the MT-KT attachment during anaphase, which suggests that microtubule depolymerizing forces are not capable of disrupting this attachment. Indeed, the resistance given by the bridged chromosomes interferes with their segregation, and they remain lagging close to the cell equator. Along with mitosis progression we observed that cytokinesis constriction constitutes a critical point for chromatin bridge breakage, and later in interphase the unbroken bridges connecting the two sister cells may pull the chromosome out of the nuclei. Our results suggest that some bridges are strong enough to remain unbroken, they lag behind the two nuclei and are then included into micronuclei, which originates aneuploid progeny.

Material and Methods

Tissue culture and treatments

Human mammary epithelial cells (HMECs) and *Potorous tridactylus* kidney cells (Ptk1 cells) were obtained from Cell Applications Inc. (San Diego, CA) and American Type Culture Collection respectively. HMECs were cultured in serum-free MEGM medium (BioWhittaker) supplemented with epidermal growth factor, insulin, hydrocortisone, gentamicin/amphotericin-B and bovine pituitary extract. Ptk1 cells were maintained in Ham's F12 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) supplemented with 10% of fetal calf serum, antibiotics and antimicrobials. All cells were kept at 37°C and 5%CO₂, in a humidified atmosphere. To perform the experiments, cells were grown on acid-washed coverslides.

To experimentally induce anaphase bridges in Ptk1 cells, Bleocin™ (Antibiotic from

Streptomyces verticillus; Calbiochem) was added to the exponentially growing cells at a final concentration of 60µg/ml. Cells were next incubated with the drug during 3 hours under conditions of 37°C and 5%CO₂, in a humidified atmosphere. Afterwards, the drug was washed out using pre-warmed medium. Then, Bleomycin-treated Ptk1 cells (Bleo-Ptk1) containing fresh media were placed back into the incubator and left to recover overnight.

Immunofluorescence

HMECs were rinsed briefly by adding PBS carefully to avoid the loss of mitotic cells, and successively pre-fixed in 4% formaldehyde. After 10 seconds, they were rapidly rinsed with PBS and permeabilized for 5 min in a solution of PHEM containing 0.5% Triton X-100. Cells were fixed during 20 min in 4% formaldehyde following three washes in PBS. Ptk1 cells were first rinsed in PBS and fixed in 5mM EGTA containing 95% methanol for 5 min at room temperature and 20 min at -20°C. Then they were washed in PBS and permeabilized in PHEM containing 0.5% Triton X-100 for 5 min. The following steps were the same for both cell types. HMECs and Ptk1 cells fixed on coverslides were blocked in 10% boiled goat serum (BGS) for 1 h at room temperature. Primary antibodies against kinetochores (CREST, human anticentromere protein; Antibodies Inc.) and microtubules (mouse-anti- α -tubulin, DM1A; Sigma-Aldrich) were diluted with 5% BGS at a final concentration of 1:50 and 1:250 respectively. Three rounds of washes with PBST (PBS with 0.05% Tween 20) were performed after primary antibody incubation. Finally, secondary antibodies X-Rhodamine goat-anti-human and Cy5 goat-anti-mouse (1:50, AbCam and Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) were incubated for 45 min at room temperature and successively washed with PBST. DNA was counterstained with 1µM YoPro (Invitrogen; Molecular Probes) diluted in PBST for 5 min. Coverslides were finally mounted in antifade solution containing 90% glycerol and 0.5% N-propyl gallate.

Image acquisition and analysis

Immunostained cells were imaged using a Nikon Eclipse TE2000-U inverted microscope equipped with a Swept Field Confocal system (Prairie Technologies). The confocal head contained filters to collect fluorescence at the 488nm, 568nm and 647nm wavelengths excited by a 400mW argon laser and a 150mW krypton

laser. Cells were visualized through a 100x1.4 NA Plan-Apochromatic phase-contrast objective lens. Then images were acquired in z-stack series at 0.6 μ m intervals through each cell with an HQ2 CCD camera (Photometrics) controlled by NIS-Elements software.

Fluorescence intensity measurements of the microtubule proteins α -tubulin and EB1 were performed at the microtubule-kinetochore interface with a specialized option from the NIS-Elements software. A squared region of interest measuring 10 μ m² was drawn on the microtubule tip of the microtubule-kinetochore interface. The background fluorescence intensity was measured in two smaller regions of interest (5 μ m²/each) placed immediately lateral to the two sides of the microtubule bundle, and then averaged and subtracted from the microtubule bundle intensity. The microtubule-kinetochore union was considered to be present when, after background subtraction, the value of au (arbitrary units) was >40 in the case of α -tubulin immunostaining. A microtubule tip was considered to contain EB1 protein when, after background subtraction, au was >40.

3D distance measurements connecting two different points of the cell through the Z axis were performed with a special function from the NIS-Elements software. This function permits points located at different focal planes to be connected by scrolling through the Z axis. The starting and end points whose distance had to be measured were carefully set by simultaneously visualizing the XY, YZ and XZ axes of the point of interest. The distances analyzed were those connecting the opposite spindle poles (pole-pole distance) and the KT to the corresponding pole (KT-pole distance). KT-pole distances from bridging chromosomes were measured at each end of the bridge. The KT-pole distance value corresponding to the non-bridging chromosomes was the averaged length from five different measurements.

Statistics

A Student's t test was used to compare two groups of values. A *p* value of less than 0.05 was considered to be significant.

Results and Discussion

Most chromatin bridges do not break during anaphase

The BFB cycle is widely accepted to explain the behavior of fused chromosomes. According to this model, chromatin bridges would invariably undergo breakage during mitosis, likely during anaphase. However, some studies suggest that bridged chromatin may not break, but instead undergoes different fates. Mullins and Biesele (1977) showed that pairs of daughter cells were occasionally observed in which incomplete karyokinesis resulted in their nuclei being connected by a strand of nuclear material traversing the intercellular bridge and midbody. Similarly, persistent chromatin bridges beyond the completion of mitosis can inhibit cell abscission (Steigemann et al., 2009). Thus, we first asked whether a chromatin bridge's main fate is indeed breakage during mitosis or if some other outcomes are more commonly observed.

We performed fixed-cell experiments in which we determined the frequencies of chromatin bridges at different stages of mitosis, before and after cytokinesis constriction, and at a post-mitotic stage that we referred to as "early G1" (Figure 1A). If most bridges broke during anaphase, we would expect most of the chromatin bridges to disappear by telophase. Instead, in HMECs we found that the fraction of telophase cells exhibiting chromatin bridges was about 60% of the anaphase cells with bridges, which indicates that only 40% of the chromatin bridges broke during anaphase. We also determined the frequency of "early G1" cells exhibiting chromatin bridges. Early G1 cells were defined as cells that have completed mitosis but in which the two daughter cells are still connected by a cytoplasmic bridge. The frequency of early G1 cells with chromatin bridges (33%) was higher than the frequency of either anaphase (29%) or telophase (17%) cells with chromatin bridges (Figure 1B). This unexpected result can be explained by the fact that the presence of chromatin bridges has been shown to prevent abscission (Steigemann et al., 2009). Therefore, some other cells at the same cell cycle stage, but without chromatin bridges, would probably have already undergone abscission, and would therefore not be classified as early G1 cells, which would bias the observed value. Nevertheless, this result shows that many chromatin bridges do not break during anaphase/telophase, and instead

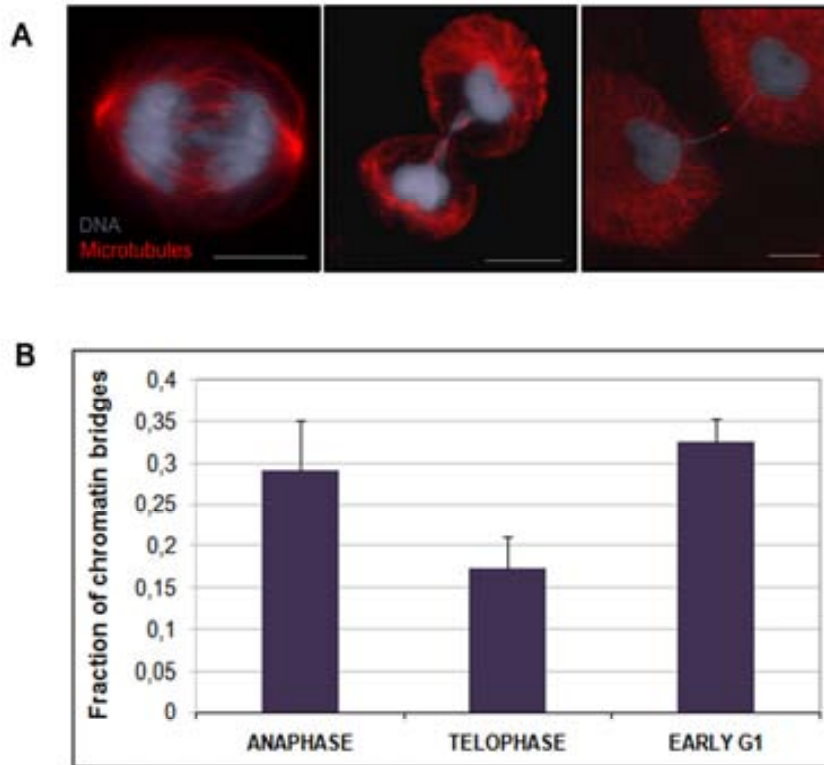


Figure 1. Chromatin bridges in HMECs. A) Examples of anaphase, telophase (after furrow cytokinesis constriction), and early G1 cells from HMECs with chromatin bridges. Cells in telophase were distinguished from early G1, because in the latter the cell surface is flattened. The scale bar represents 10 μm . B) Histogram with frequencies of bridges in anaphase, telophase, and early G1 per cell (mean \pm s.e.).

persist well beyond completion of mitosis. Although metaphase chromosomes can be stretched to 15 times their normal length (Houchmandzadeh et al., 1997), it is conceivable that the fate of bridges during cell division would be influenced by the intercentromere distances of the bridge. As long as the intercentromeric distance from the supercoiled bridged chromatin is shorter than the spindle axis, the pulling force involved in depolymerizing microtubules towards opposite poles at anaphase could cause chromatin bridges to break (Shimizu et al., 2005). Longer distances between the two centromeres of a bridged chromosome would favor their resistance as an unbroken fiber. But there are other possibilities, such as the chromatin intervening in the bridge remaining partially structured as a condensed chromosome and thus opposing resistance to the force exerted by kinetochore microtubules.

Some chromatin bridge kinetochores appear stretched due to insufficient kinetochore microtubule polymerization.

It has been shown previously that, under particular circumstances, kinetochore microtubules (k-MTs or k-fibers) can polymerize rather than depolymerize during anaphase. This is true for anaphase lagging chromosomes with merotelically attached KTs (KTs bound to MTs from both spindle poles rather than just one), whose k-fibers lengthen during anaphase to compensate for spindle elongation (Cimini et al., 2004). Chromatin bridges are similar to merotelically attached chromosomes in the sense that the shortening of the k-fibers during anaphase is opposed by the presence of intervening chromatin. In the case of chromatin bridges, the intervening connection is the chromatin, which is probably more “stretchable” than a single KT. However, there might be a limit to how much the chromatin can be stretched. Moreover, it is believed that MT

polymerization at the KT-MT interface responds to tension (Maddox et al., 2003). Therefore, the force exerted by the intervening chromatin would oppose the force exerted by the anaphase B spindle elongation, thus increasing tension at the KT-MT interface, which may promote MT polymerization (Figure 2A). We reasoned that the appearance of bridge KTs as either stretched or unstretched might depend on the efficiency at which the associated k-fiber lengthens during spindle elongation. To test this hypothesis, we quantified the amount of EB1 (known to localize at the tip of polymerizing MTs) at KT from normal non-bridging anaphase chromosomes (non-bridge KTs), stretched bridge KTs, and unstretched bridge KTs (Figure 2B). Firstly, we found that immunostained anaphases showed EB1 positive staining at the interface of normal KTs in a proportion of 33%. This result was quite unexpected because, until now, the dynamics of the k-fibers during anaphase have been described to consist in depolymerization at the plus and minus MT ends, which leads to global attrition of the k-fiber (Brust-Mascher and Scholey, 2002; Maddox et al., 2002; Sharp et al., 2000). These results suggest that the dynamics of conventional k-fibers during anaphase include some polymerization on kinetochore-associated plus ends. In accordance with this interpretation, *in vivo* observations in stably transfected EB1-expressing Ptk1 cells also showed periods of partial microtubule polymerization at the positive MT tip during anaphase (Tirnauer et al., 2002). Other studies on k-fiber dynamics during anaphase suggest that the velocity of chromatid migration in normal anaphases is variable. Whereas k-fiber shortening at the minus end was constant, the k-fiber length exhibited periods of abrupt shortening combined with periods without net shortening, which suggests that the plus MT end alternate polymerization and depolymerization at anaphase (Zhang et al., 2007).

Both stretched and unstretched bridge KTs showed an EB1 fluorescence signal more frequently than non-bridge KTs (Figure 2C and D); however, this difference was only significant for unstretched bridge KTs (Student's t test, $p < 0.05$). KTs of bridged chromatin mainly appeared stretched when there was less EB1 at the positive tip of KT-MT. Therefore, the stretched appearance of certain bridge KTs could be explained by insufficient polymerization of the associated k-fiber. The stretched

kinetochore appearance would be a consequence of a period without polymerization. Overall, the observation that unstretched bridge KT has more chances of showing EB1 at the plus ends of k-fibers suggests that the resistance given by the chromosome structure when the bridge is pulled to the spindle poles may favor k-fiber polymerization. It should be taken into consideration that these results could be underestimated because we were not able to discriminate between bridges under tension and those that were not tensed as they had more chromatin intervening between the centromeres.

Bridge kinetochores are shifted closer to the spindle equator compared to non-bridge kinetochores

According to the BFB cycle model chromatin bridges are expected to break during anaphase. However, as described above, we found that some chromatin bridges persisted into telophase without breaking. In accordance with this result, a recent study reported that chromosomes that exhibit high levels of telomere attrition, and consequently have more probability of being involved in anaphase bridges, are more likely to appear in aneuploid numbers in proliferating cells (Pampalona et al., 2010b). These results suggest that the decrease in chromatin bridges from anaphase to telophase could also be due to the segregation of the bridged chromosome to one of the spindle poles (i.e., chromosome non-disjunction). To test this hypothesis, we mapped the position of bridge KTs with respect to the spindle equator (shown in Figure 3A) in a large sample of cells exhibiting chromatin bridges (Figure 3B). We found that on average, the bridge KTs were located much closer to the spindle equator and farther away from the spindle pole compared to the average position of non-bridge KTs in both HMECs (Figure 3C) and bleo-Ptk1 cells (Figure 3D). Thus, tensed bridges encounter problems during anaphase in their segregation towards the spindle poles as they are positioned nearer to the equator of the cell.

It could be argued that the shift in position of bridge KTs towards the spindle equator may be the result of detachment of k-MTs caused by the pulling forces exerted by the intervening chromatin. To test this hypothesis, we studied the KT-MT attachments in anaphase bridges by analyzing the fluorescence intensity of the k-

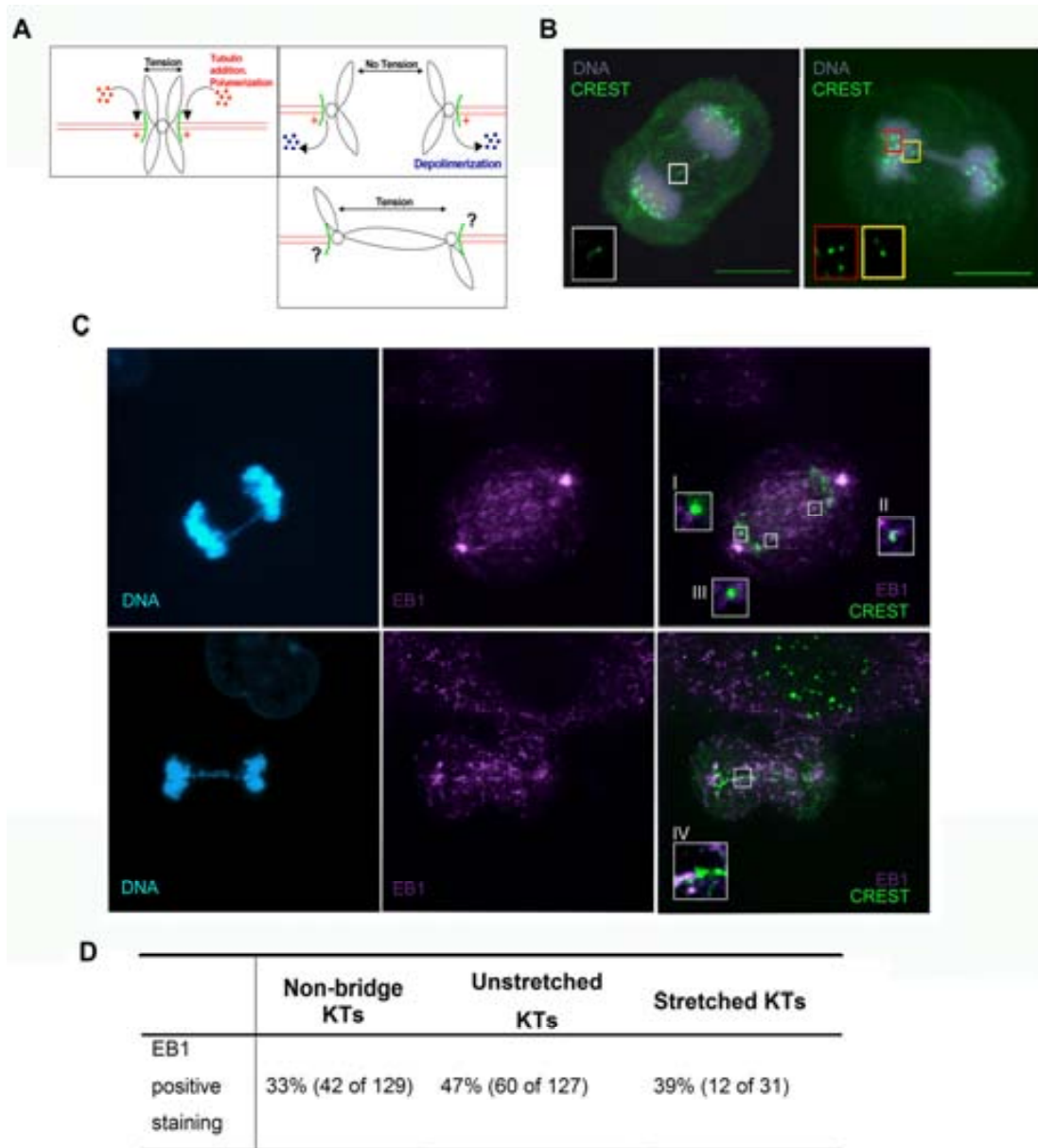


Figure 2. Microtubule polymerization at plus MT ends during anaphase. A) A net MT poleward flux acts during metaphase due to the polymerization of the plus MT ends and depolymerization of the minus MT ends. During anaphase depolymerization occurs at both MT ends. The MT dynamics at the KT interface of chromatin bridges needs to be investigated. **B)** Non-bridge KT (right image, red frame), stretched bridge KT (left image, white frame) and unstretched bridge KT (right image, yellow frame) in anaphase cells. The scale bar represents 10 μm . **C)** Images of KT interfaces showing EB1 positive staining (non-bridge KT, inset I; bridge KT, insets II, III and IV). **D)** Table showing the frequencies of EB1 staining in the interface of non-bridge KT, stretched bridge KT and unstretched bridge KT

fibers attached at the KT interface (Figure 4). A KT was considered attached to a k-fiber when, after background subtraction, the intensity value was >40 AU. We analyzed a total of 92 bridges

in HMECs and 86 bridges in bleo-Ptk1 cells. Anaphase cells were classified and distributed as anaphase A, when there was no significant spindle elongation and as anaphase B, when

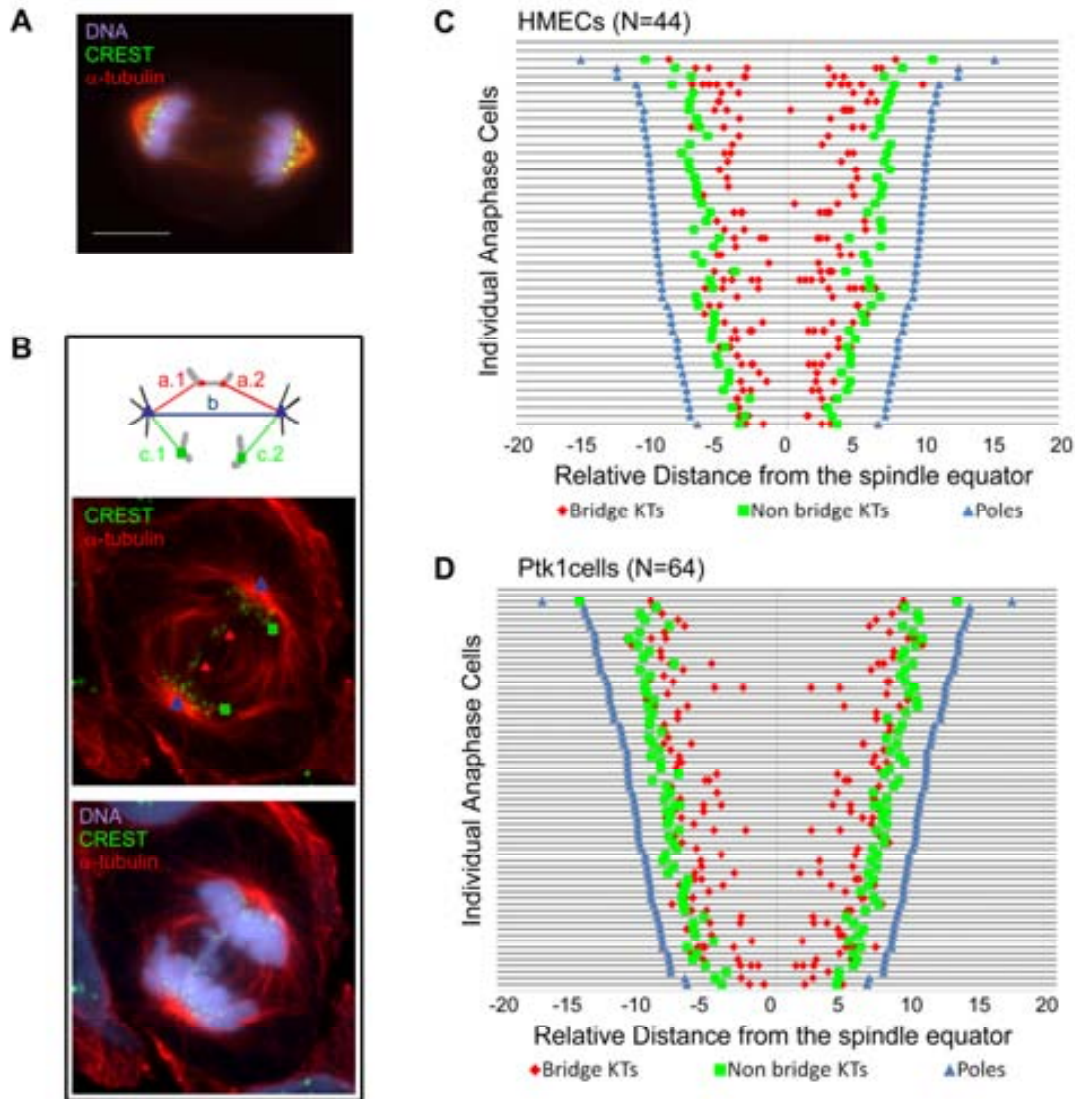


Figure 3. Position of KTs of bridged and non-bridged chromosomes in anaphase cells. **A)** Anaphase from HMECs without chromosome bridging. The scale bar represents 10 μm . **B)** Diagram illustrating the 3D length measurements. The (a.1) and (a.2) lengths correspond to the distance connecting the kinetochores from a bridge (bridge KTs) with the corresponding poles. Equivalently, the (c.1) and (c.2) lengths correspond to the distance connecting the kinetochores from a normal chromatid with the corresponding poles. The (b) distance refers to the measurements taken between opposite poles from the cell. The picture corresponds to a HMEC in anaphase A showing bridge KTs (rhombus), non-bridge KTs (squares) and opposite poles (triangles). **C and D)** Graphs containing the position of the measured elements. Each line represents an individual HMEC (**C**) or Bleo-Ptk1 cell (**D**) in anaphase. The value of non-bridge KTs was the average length shown by 5 non-bridge KTs.

prominent cytoplasm elongation occurred (Figure 4D). We found that all chromatin bridges showed KT-MT attachments during anaphase A in both cell types and nearly all bridges in ana-

phase B cells (90% in HMECs and 97% in bleo-Ptk1 cells) (Figure 4B and C). These results demonstrate that during anaphase A and B most bridges maintain their MT-KT attachment,

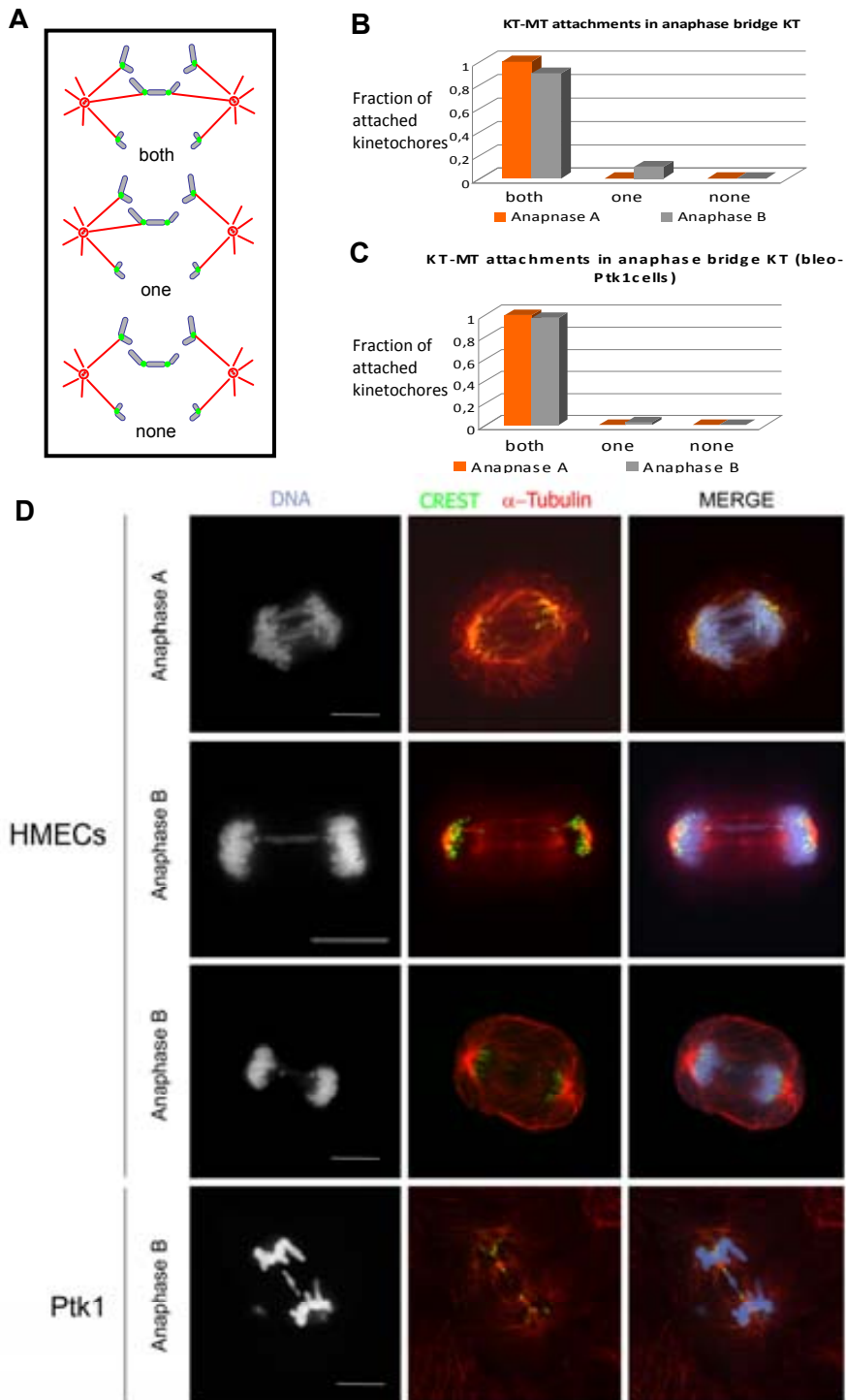


Figure 4. KT-MT attachments in HMECs and Ptk1 cells. **A**) Diagram showing anaphase plates in which KTs from chromatin bridges are attached to the microtubules emanating from both, one or none of the spindle poles (top, middle and bottom respectively). **B and C**) Graph representing the fraction of attached kinetochores during anaphase A (orange column) and anaphase B (grey column) in HMECs (**B**) and Ptk1 cells treated with bleomycin (**C**). **D**) Anaphase A (upper image) and anaphase B (lower images) HMECs in which microtubules emanating from opposite poles attach the corresponding kinetochores of the anaphase bridges. Anaphase B Ptk1 cell in which the KTs from the bridge are attached to the corresponding k-fibers. The scale bar represents 10 μ m.

which suggests that the forces exerted by the intervening chromatin stabilize the KT-MT connection. These hyperstable attachments would be difficult to break and can result in MT polymerization at the KT/MT interface (Figure 2).

While performing this analysis, we also noticed that, as cells progressed from telophase to early G1, the number of bridges in which we could visualize kinetochores (KTs) (Figure 5B) at at least at one end of the bridge increased significantly (Figure 5 A and C). In other words, whereas in telophase cells almost 50% of the bridges had KT embedded in the two groups of segregating chromosomes, in 75% of the early G1 cells KT could be visualized at at least one end of the bridge out of the nuclei, and sometimes fully disconnected from the two bulks of segregating chromatin (Figure 5A). Similar results were observed in Ptk1 cells (Figure 5C). These results suggest that persistent chromatin bridges can pull the two ends inward strongly enough to move the KTs at the end of the chromatin bridge away from the main nuclei, thus potentially resulting in the formation of micronuclei in the daughter cells. Alternatively, the observation that there are few bridges with attached k-fibers in the kinetochore of only one side clearly shifted to the opposite pole (i.e., the pole where the kinetochore at the other end of the bridge was localized) strongly suggests that these bridges can be dragged towards one daughter cell, and therefore originate a non-disjunction.

Concluding remarks

In summary, our results show that the force applied by microtubules does not always sever the bridge during anaphase. On the contrary, the resistance given by the chromatin thread could promote microtubule polymerization. This causes a delay in their segregation to the poles. Then in telophase and early G1, these unbroken bridges would remain completely out of the nucleus and form a disconnected but intact bridge. These structures may ultimately be lost as micronuclei. Accordingly it has been demonstrated that whole chromosome losses are related to telomere shortening, a source of anaphase bridges (Pampalona et al., 2010b). Although it was previously thought that the tension provided by the bridge could eventually disconnect all of the kinetochore fibers (Stewenius et al., 2005), we observed that this event is rare. Indeed, we only observed in the

stretched kinetochores that the tension could disconnect, if do, only a few microtubules from the attachment, but not all them. Therefore, aneuploidies appear to be related to bridges occurring after microtubules are released in telophase. Our model does not disregard non-disjunction events. These may occur when the bridge remains near the equator and, during the cytokinetic furrow constriction, it may be generated a flux that could help to sweep whole bridges into one cell.

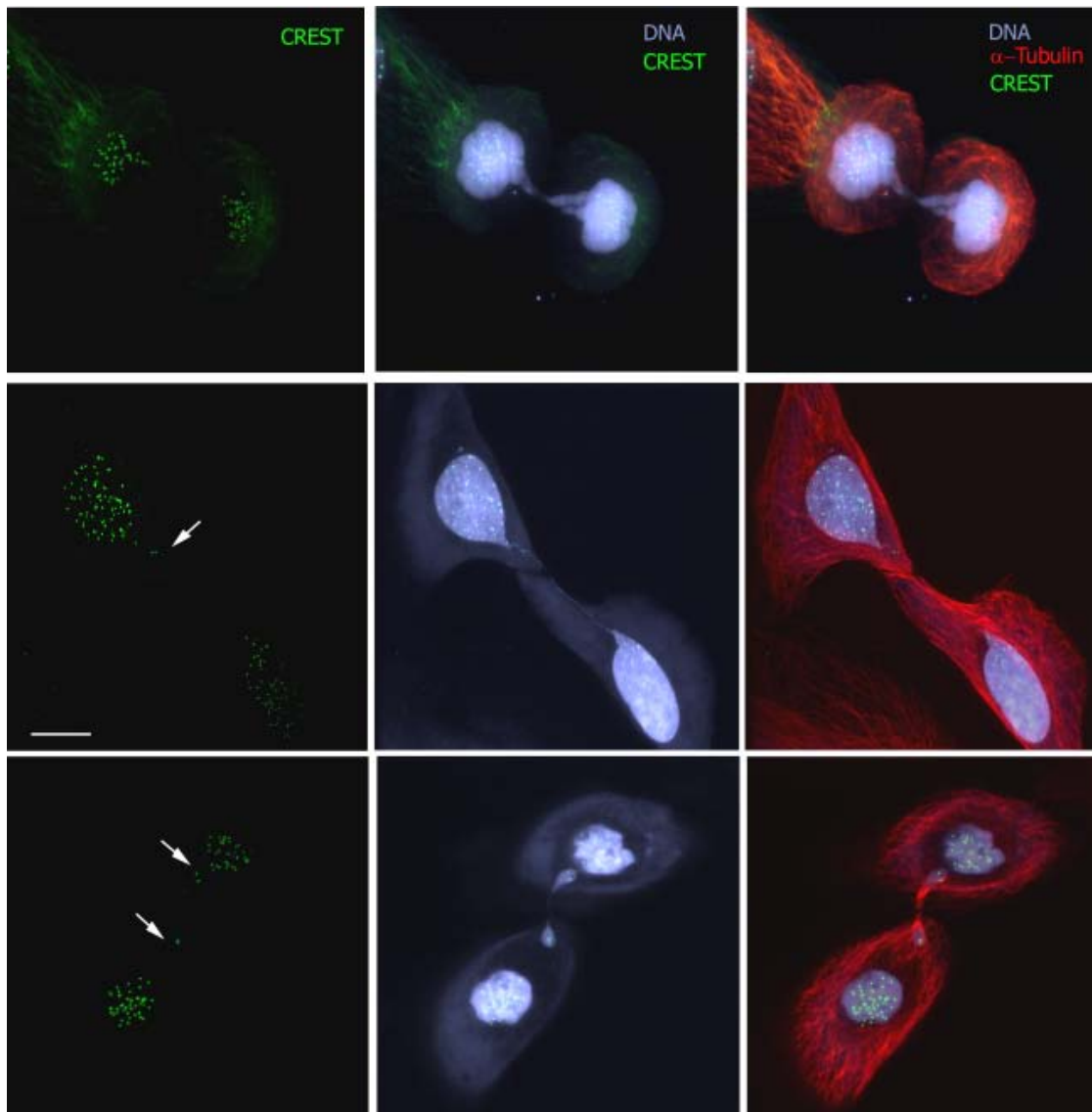
References

- Capper, R., B. Britt-Compton, M. Tankimanova, J. Rowson, B. Letsolo, S. Man, M. Haughton, and D.M. Baird. 2007. The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells. *Genes Dev.* 21:2495-508.
- Cimini, D., L.A. Cameron, and E.D. Salmon. 2004. Anaphase spindle mechanics prevent mis-segregation of merotelically oriented chromosomes. *Curr Biol.* 14:2149-55.
- d'Adda di Fagagna, F., P.M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N.P. Carter, and S.P. Jackson. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *NATURE.* 426:194-8.
- Griffith, J.D., L. Comeau, S. Rosenfield, R.M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, and T. de Lange. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell.* 97:503-14.
- Hoffelder, D.R., L. Luo, N.A. Burke, S.C. Watkins, S.M. Gollin, and W.S. Saunders. 2004. Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma.* 112:389-97.
- Houchmandzadeh, B., J.F. Marko, D. Chatenay, and A. Libchaber. 1997. Elasticity and structure of eukaryote chromosomes studied by micromanipulation and micropipette aspiration. *J Cell Biol.* 139:1-12.
- Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *NATURE.* 396:643-9.
- Maddox, P., A. Straight, P. Coughlin, T.J. Mitchison, and E.D. Salmon. 2003. Direct observation of microtubule dynamics at kinetochores in *Xenopus* extract spindles: implications for spindle mechanics. *J Cell Biol.* 162:377-82.
- Pampalona, J., D. Soler, A. Genesca, and L. Tusell. 2010b. Whole chromosome loss is promoted by telomere dysfunction in primary cells. *Genes Chromosomes Cancer.* 49:368-78.
- Romanov, S. 2001. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature.* 409:633-637.
- Shimizu, N., K. Shingaki, Y. Kaneko-Sasaguri, T. Hashizume, and T. Kanda. 2005. When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage

plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Exp Cell Res.* 302:233-43.
 Steigemann, P., C. Wurzenberger, M.H. Schmitz, M. Held, J. Guizetti, S. Maar, and D.W. Gerlich. 2009. Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell.* 136:473-84.
 Stewenius, Y., L. Gorunova, T. Jonson, N. Larsson, M. Hoglund, N. Mandahl, F. Mertens, F. Mitelman, and D. Gisselsson. 2005. Structural and numerical

chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:5541-6.
 Takai, H., A. Smogorzewska, and T. de Lange. 2003. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol.* 13:1549-56.

A



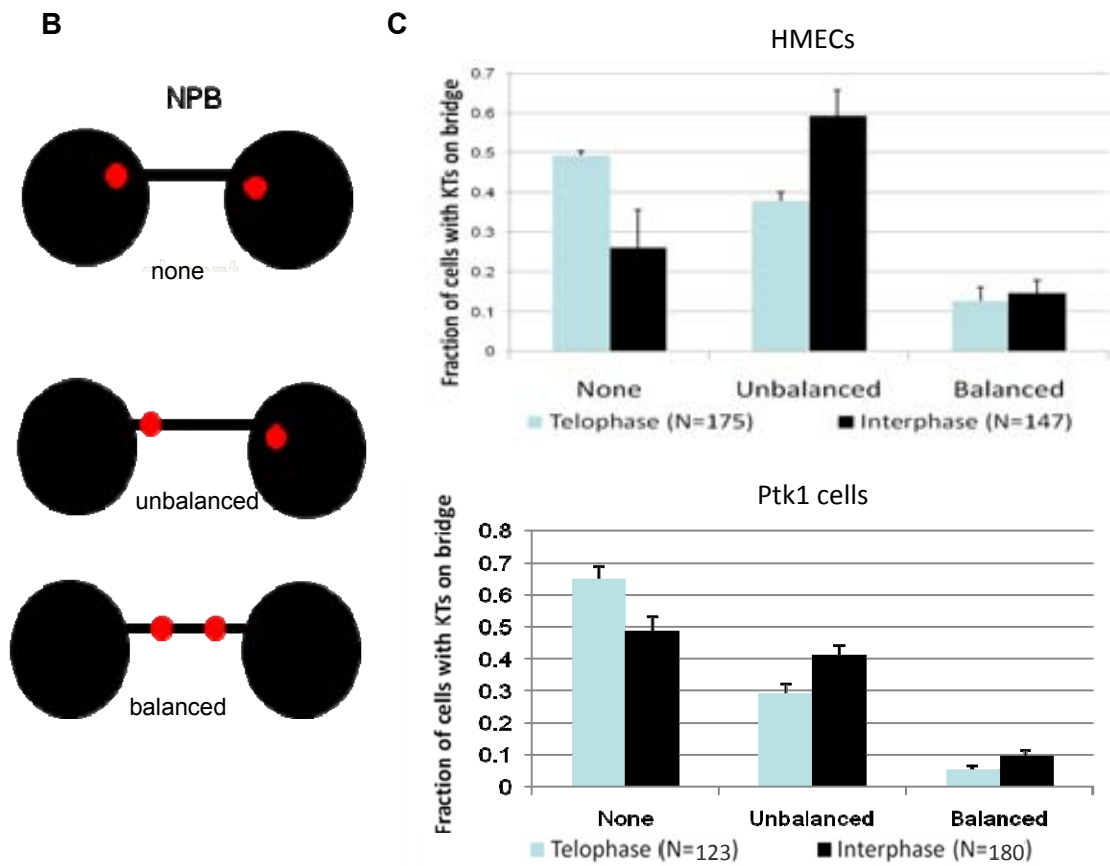
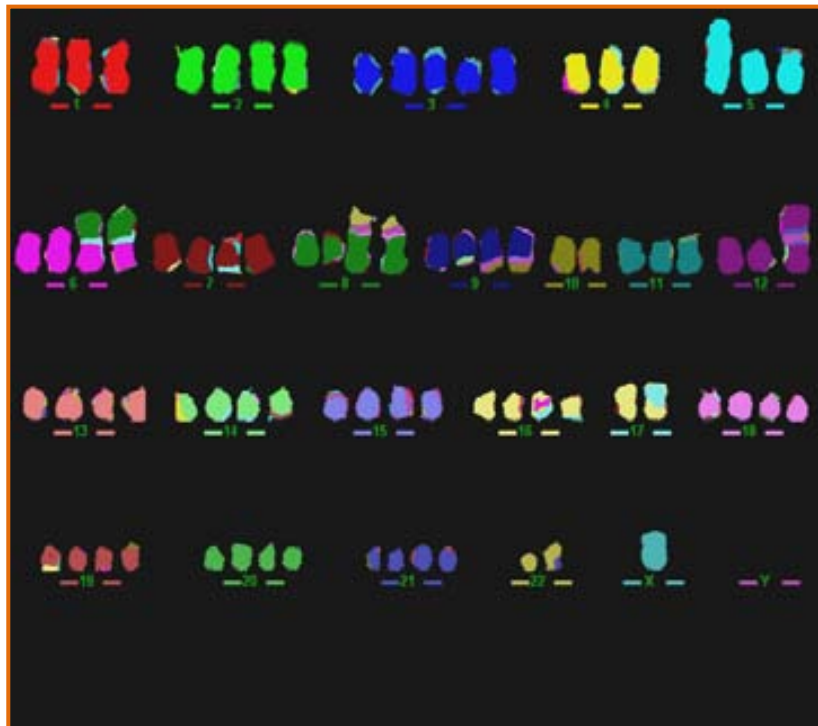


Figure 5. KT localization on chromatin bridges in HMECs and Ptk1 cells. A) Representative examples of telophase, and interphase HMECs with chromatin bridges. The scale bar represents 10 μ m. B) KT localization on bridged chromatin relative to the main nuclei in telophase and interphase cells. Three possibilities are depicted. C) Graph representing the fraction of cells with both (balanced), one (unbalanced) and none of the kinetochores on the bridge in telophase and interphase, in HMECs (upper graph) and Ptk1 cells (lower graph)

Treball IV

Telomere Dysfunction Causes Cytokinesis Failure and Leads to the Accumulation of Highly Unstable Polyploid Cells *(en procés d'avaluació)*



Telomere dysfunction causes cytokinesis failure and leads to the accumulation of highly unstable polyploid cells

Judit Pampalona¹, Anna Genescà¹, Laura Tusell^{1,*}

¹Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Bioscience School, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, E-08193 Spain

*Correspondence: laura.tusell@uab.es

SUMMARY

It has been suggested that a transient phase of tetraploidization has a causative role in cancer. Tetraploids, acting as the driving force that promotes further aneuploidy and genomic instability, would gradually generate subtetraploid lineages of unstable cells that might contribute to human carcinogenesis. We report that human mammary epithelial cells exhibiting telomere dysfunction due to p16^{INK4a} silencing engender tetraploid cells through cytokinesis failure. Binucleated polyploid cells accumulated in serial passages after abortive cytokinesis due to persistence of anaphase bridges with long intervening chromatin in the cleavage plane. Despite extra centrosome numbers, polyploid cells nucleated pseudobipolar spindles, thus limiting massive cell death. Chromosomal rearrangements in metaphase spreads and the distribution of individual chromosomes in interphase nuclei revealed that 4N cells containing extra centrosomes can increase their intrinsic telomere-dependent chromosome instability, which yields highly unstable genomes. These observations give new insights into how telomere dysfunction may be behind the initial stages of human carcinogenesis.

Introduction

Most cancer cells are genetically unstable (Lengauer et al., 1998) and accumulate unbalanced chromosome rearrangements, entire chromosome aneuploidies and increased numbers of chromosome sets (Mitelman Database:

<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>). Cell populations with chromosome contents from 42 to 95 are often found in prostate, pancreas, ovary, large intestine, liver and breast adenocarcinomas, as well as in squamous cell carcinomas of the skin (Storchova and Kuffer, 2008). Moreover, tetraploidy is usually observed in the early stages of cervical carcinogenesis (Olaharski et al., 2006) and in a pre-malignant condition called Barrett's esophagus, in which tetraploid cells have been correlated with the loss of p53 and detected before gross aneuploidy occurs (Galipeau et al., 1996; Maley, 2007).

A long standing hypothesis on tumourigenesis suggests that tetraploid cells (4N) can act as intermediates that catalyze the generation of unstable aneuploid cells (Shackney et al., 1989; Storchova and Pellman, 2004; Ganem et al., 2007). This assumption is based on several studies that show that tetraploidy leads to increased chromosome instability in eukaryotic cells (Fujiwara et al., 2005; Mayer and Aguilera, 1990; Storchová et al., 2006). When cells become tetraploid, they acquire extra centrosomes that can potentially lead to chaotic multipolar mitosis in which sister chromatids are frequently missegregated between daughter cells (reviewed by Nigg, 2002; Boveri, 2008). Tumourigenesis via this tetraploid intermediate could explain why polyploid cells are observed in early neoplastic stages, and why cancer cells frequently contain supernumerary centrosomes and a high rate of whole chromosome missegregation. The most direct evidence of the

high tumorigenic potential of tetraploid cells comes from the observation that 4N p53-null mammary epithelial mouse cells can initiate tumors in immunocompromised mice, whereas the isogenic diploids cannot (Fujiwara et al., 2005). This evidence supports the idea that tetraploidy is an intermediate for chromosome instability (CIN) and tumorigenesis.

Besides bearing near-tetraploid genomes, another feature of human preneoplastic cells is the presence of very short telomeres (Meeker et al., 2004a; Meeker et al., 2004b). Telomeres are nucleoprotein complexes that form a loop structure at the end of chromosomes that protects them from end-to-end fusion. Abnormal telomere shortening due to continuous cell proliferation in an environment with checkpoint deficiencies promotes the appearance of uncapped chromosome ends that may initiate repeated breakage-fusion-bridge (BFB) cycles. This leads to massive CIN that is visualized as complex types of genomic abnormalities, including loss of heterozygosity, gene amplification, chromosome reorganizations and aneuploidy, which are characteristic of most human tumor cells (Mitelman Database: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>). The incorporation of telomere dysfunction in a p53 haploinsufficient mouse model led to a shift in its tumor spectra towards carcinomas, the prevalent tumor type in adult humans. Furthermore, their genomic profile changed such that unbalanced translocations, amplifications and deletions, generally rare in mouse tumors, became abundant (Artandi et al., 2000). This validates the idea that telomere-attrition-induced genomic instability together with checkpoint deficiencies fuels carcinogenesis.

Given the significance of telomere dysfunction and tetraploidy in early human cancer lesions, we investigated the possible connection between these two important promoters of CIN. For this purpose we used human epithelial cells (HMECs) derived from normal mammary glands. In these cells, spontaneous p16^{INK4a} promoter hypermethylation overrides the pRB pathway, which allows cells with critically short and dysfunctional telomeres to proliferate (Romanov et al., 2001). The resulting end-to-end chromosome fusions then tend to bridge at anaphase if a twist in their intercentromeric region occurs. We have already shown that these chromatin bridges can break and originate structural chromosome rearrangements and amplification events (Soler et al., 2005; Tusell et al., 2008), or alternatively, the bridge can lead to

whole chromosome gains and losses (aneuploidy) (Pampalona et al., 2010b). It has recently been determined that the presence of bulk chromatin occluding the cleavage plane can induce furrow regression (Norden et al., 2006; Mendoza et al., 2009; Steigemann et al., 2009). Therefore, it is tempting to speculate that chromatin bridges resulting from telomere attrition may interfere with the completion of cytokinesis. Here we show that HMEC polyploidization occurs as a consequence of long unbroken DNA bridges spanning the cleavage site. The resulting cells that contain extra sets of centrosomes nucleate pseudobipolar spindles that, in this background of telomere dysfunction, are responsible for the acute CIN exhibited by tetraploids.

Results

Extra chromosome sets accumulate in primary HMECs with telomere dysfunction

HMECs cultured *in vitro* in a serum-free medium exhibit eroding telomeric sequences and ultimately enter a telomere-based crisis, generating the types of chromosomal abnormalities seen in the earliest lesions of breast cancer. Early studies using the HMEC model revealed the presence of structural (Romanov et al., 2001; Soler et al., 2005; Tusell et al., 2008) and numerical chromosome aberrations (Pampalona et al., 2010b), as well as certain levels of polyploidy that coincide with a late stage of the culture (Romanov et al., 2001). To investigate the emergence of polyploid subpopulations in HMECs we examined their DNA content by flow cytometry at different population doublings (PDs). We focused this analysis on cells derived from breast specimens from two different donors (219-7 and 830) in order to take into account interindividual variations. Figure 1A, upper panels, shows the results of the cytometric analysis for donor 219-7. An increase in the 4N fraction was observed in late passage HMECs compared with their early counterparts (from 24% to 40%). The cytometric analysis of HMECs derived from the second donor also demonstrated a significant accumulation of 4N cells with PDs (Figure S1). To check whether the increase in cells in the 4N fraction really did reflect an increase in tetraploid cells in G1 and not in diploid cells with replicated DNA, we performed a flow cytometry bivariate analysis of both the DNA content and cyclin D1 protein, which is only expressed during the G1 cell cycle phase (Juan et al., 1996). This approach showed that the majority of 4N cells were positive for cyclin D1 in both donors;

therefore, they exhibited *bona fide* traits of real tetraploidy (Figure 1A lower panels and Figure S1). To reinforce these results, we also checked for ploidy levels on a cell per cell basis. By scoring centromeric signals of two different chromosomes in donor 219-7 (Figure 1B), we confirmed that there was a tetraploid population that increased progressively throughout the cell culture (Figure 1C). The frequency of polyploid cells, i.e. showing ≥ 4 hybridization signals for each chromosome, increased from a basal level of 8% at an early PD to 38% at PD56 (ANOVA, $p < 0.05$). It is noteworthy that the bivariate cytometric analysis also revealed a small fraction of cyclin D1 positive 8N cells that also increased at late PDs (4% vs 10% in donor 219-7 and 2% vs 9% in donor 830). Collectively our results show that there is an accumulation of tetraploid cells throughout the HMEC culture. More importantly, this 4N population is viable and able to proliferate because an octoploid population of cells emerges at the later stages of the culture.

In addition to the increasing frequencies of polyploidy with continuous proliferation, HMECs also display increasing levels of telomere dysfunction. To investigate whether there is a correlation between these two parameters, we measured telomere dysfunction by scoring the frequency of chromosome ends with undetectable PNA-FISH telomeric signals (Figure 1D). The lowest levels of telomere dysfunction were observed at the earliest PD that was coincident with the lowest polyploidy rate in the two donors (Table S1). At late PDs, telomere dysfunction affected more chromosome arms, and the tetraploidization levels also increased. To determine the degree of correlation between telomere dysfunction and the acquisition of extra chromosome sets in the same samples, we performed a regression analysis using the observed values (Figure 1E). The Spearman statistical test showed a significant correlation between polyploidy and telomere dysfunction ($r^2 = 0.895$; $p < 0.05$). Therefore, these results indicate that the emergence of polyploid cell populations is linked to the natural telomere erosion that HMECs undergo as they proliferate.

Polyploid HMEC subpopulations arise due to incomplete cytokinesis

The above results prompted us to focus on how telomere shortening might influence the formation of tetraploid cells. In *Drosophila*, unprotected telomeres trigger the spindle assembly checkpoint that stops cells progressing into anaphase (Musarò et al., 2008). Moreover, deprotection of chromosome ends on quiescent

TRF2-deficient mouse hepatocytes impedes the onset of anaphase without affecting DNA replication (Lazzerini Denchi et al., 2006). Similarly, persistent telomere deprotection due to the telomeric DNA-binding protein POT1a/b being deleted in mouse embryonic fibroblasts leads to tetraploidization (Hockemeyer et al., 2006) through endoreduplication cycles (Davoli et al., 2010). In all cases, cells skip or exit mitosis without undergoing anaphase or cytokinesis and give rise to tetraploid cells with a single nucleus. Nevertheless, polyploidy can also appear due to cytokinesis failure after karyokinesis has been completed, thus giving rise to polyploid binucleated cells. Specifically, telomere dysfunction might interfere with the completion of cytokinesis due to the formation of end-to-end chromosome fusions. To determine the mechanism by which polyploidy emerges, we scored for the presence of binucleated and mononucleated cells throughout the HMEC culture. Antibodies against alpha and beta-tubulin allowed the cell boundaries to be delineated. DNA content was determined by dual color centromeric FISH (Figure 2A). Most tetraploid and octoploid cells contained two nuclei in a single cytoplasm, which is incompatible with an endoreduplication or mitotic slippage origin but consistent with unfaithful cytokinesis. However, a fraction of mononucleated polyploid cells was also observed (Figure 2A and B). These cells did not exhibit signs of endoreduplication cycles, as FISH signals were randomly distributed within the cell nucleus (Figure 2A) and metaphase spreads of polyploid cells did not show diplochromosomes. Thus, 4N mononucleated cells probably emerged from the division of an existing binucleated polyploid cell, as it is known that binucleated cells form a single metaphase plate in the following mitosis (Sluder and Nordberg, 2004). Together, these results suggest that short dysfunctional telomeres in HMECs promote the formation of polyploid cells because the bridged chromatin interferes with the completion of cytokinesis.

To investigate further the mechanism by which this binucleate population emerges, we analyzed cell divisions of HMECs that express GFP-H2B. We followed 56 HMECs with real-time microscopy imaging from metaphase up to early G1 (when recently divided cells flatten to the surface). Half of the dividing cells had one or two anaphase bridges (32 bridges in 56 monitored cells; four of them exhibited two bridges). On average, the cytoplasm became strangled at 13.09 ± 2.66 min and 13.1 ± 2.29 min after the onset of anaphase in cells with and without

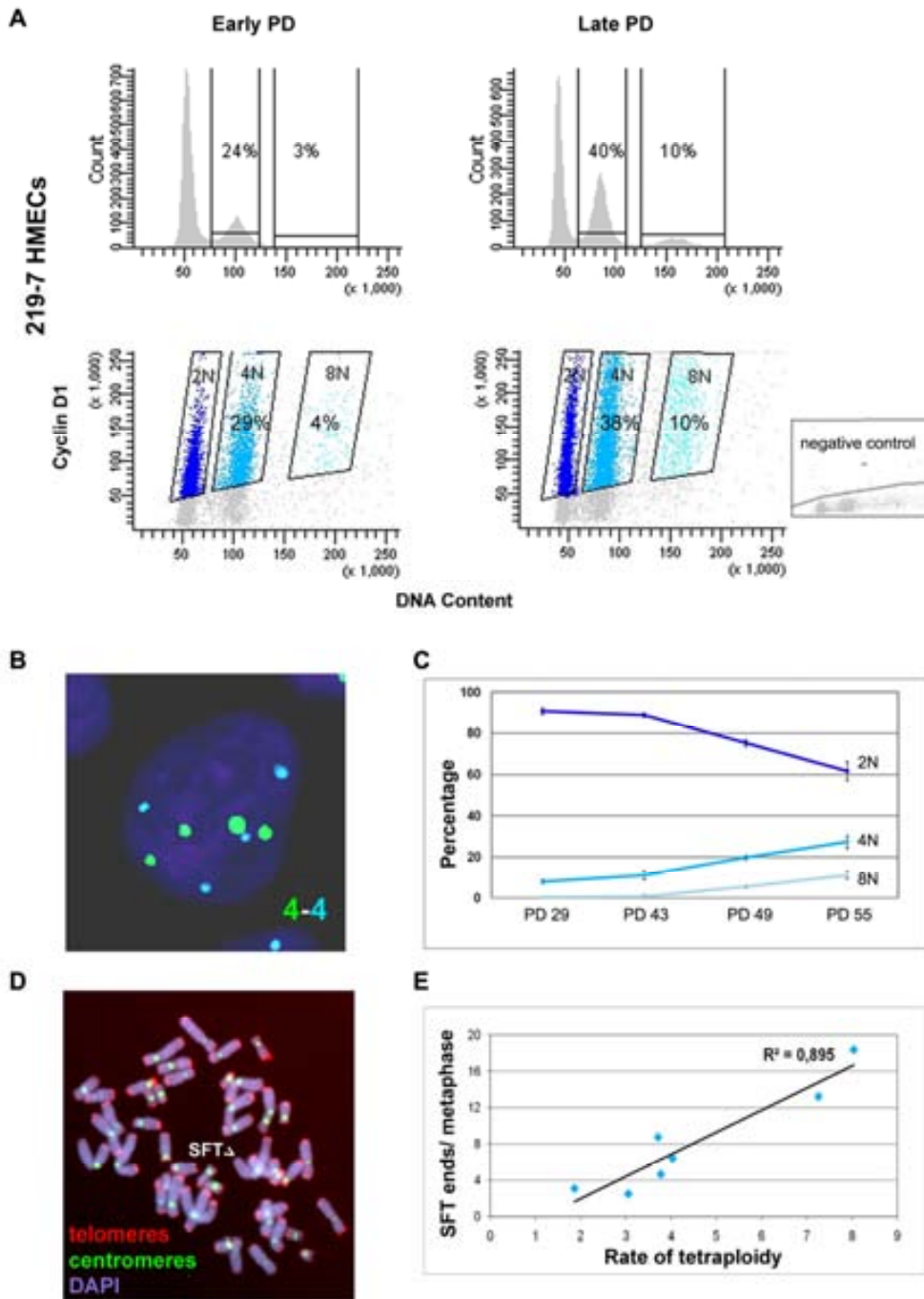


Figure 1. Telomere-dependent polyploidization. (A) Flow cytometry analysis of DNA content of 219/7 HMECs stained with propidium iodide, at two different PDs (*upper panels*). The percentage of cells with 4N and 8N DNA content is given. Bivariate analysis of DNA content and expression of cyclin D1 protein (*lower panels*), in which cyclin D1 positive cells are grouped depending on their ploidy level. Corresponding percentages are indicated. Negative control, shown in the bottom right corner, was performed without a primary antibody. (B) FISH analysis of a polyloid cell nucleus showing four centromere signals corresponding to chromosome 4 (in blue) and four signals corresponding to chromosome 18 (in green). DNA is counterstained with DAPI. (C) Graph illustrating ploidy evolution of 219-7 HMECs throughout the culture based on a cell per cell basis scoring of the number of centromeric signals. The average percentage from two independent experiments with standard deviation is shown. (D) Metaphase spread hybridized with pancentromeric and pantelomeric PNA probes. The arrowhead indicates a signal-free telomere end (SFT) on the q-arm of chromosome 1. (E) Correlation between tetraploidization events (X axis) and the corresponding levels of SFT ends (Y axis) obtained at the same PDs. For detailed values see ST1.

anaphase bridges respectively. Although the presence of bridged chromatin did not interfere with cytokinesis constriction, it might influence the final steps of cytokinesis. In this sense, although most bridges broke during the monitoring period (18 out of 32), 44% remained unbroken during the entire image recording process (14 out of 32 bridges in 10 cells). Cells with unbroken bridges had two different outcomes: 70% (7 of 10 cells with unbroken bridge/s) did not complete abscission but resulted in two sister cells connected with an over strengthened nuclear string (Figure 2C). The remaining 30% (3 of 10 cells with unbroken bridge/s) resulted in a binucleated cell at the end of mitosis (34.33 ± 8.14 min after anaphase onset) (Figure 2D). This time period is not significantly different from the 30.37 ± 4 min needed by normally segregating cells to complete cleavage (Mann-Whitney, $p=0.421$). The absence of a prolonged division for binucleated cells was quite unexpected because it has been recently demonstrated that DNA fibers occluding the cleavage plane delay abscission to prevent tetraploidization (Steigemann et al., 2009). Therefore, with the aim of elucidating whether a second wave of binucleation occurs late in G1, we again tracked HMECs during a period ranging from 3 to 10 hours after anaphase onset. This long-term live-cell imaging was performed using brightfield and allowed two waves of furrow regression to be detected, one at 38.8 ± 18.87 min that coincided with that already observed in the short-term live cell imaging analysis, and a second one that occurred several hours later (148.8 ± 44.4 min). Overall, these results suggest that cells containing over strengthened chromatin bridges trapped below the cleavage plane may delay cytokinesis constriction, providing time for bridge clearance. However, if the bridge is not resolved it can eventually induce furrow regression and generate a binucleated polyploid cell.

Unstable dicentric chromosomes with long intercentromeric distances accumulate in polyploid HMECs

Our results indicate that the presence of bridged chromosomes beyond the end of telophase causes cell polyploidization. Chromatin is known to be flexible as metaphase chromosomes can be stretched into a thin fiber that is 15 times the native chromosome length. Moreover, this thin filament can be extended six times more before breaking (Houchmandzadeh et al., 1997). However, analysis of anaphase bridge resolution in COLO320 cells suggests that chromatin is severed by the mechanical forces applied by the mitotic spindle before completion of cytokinesi

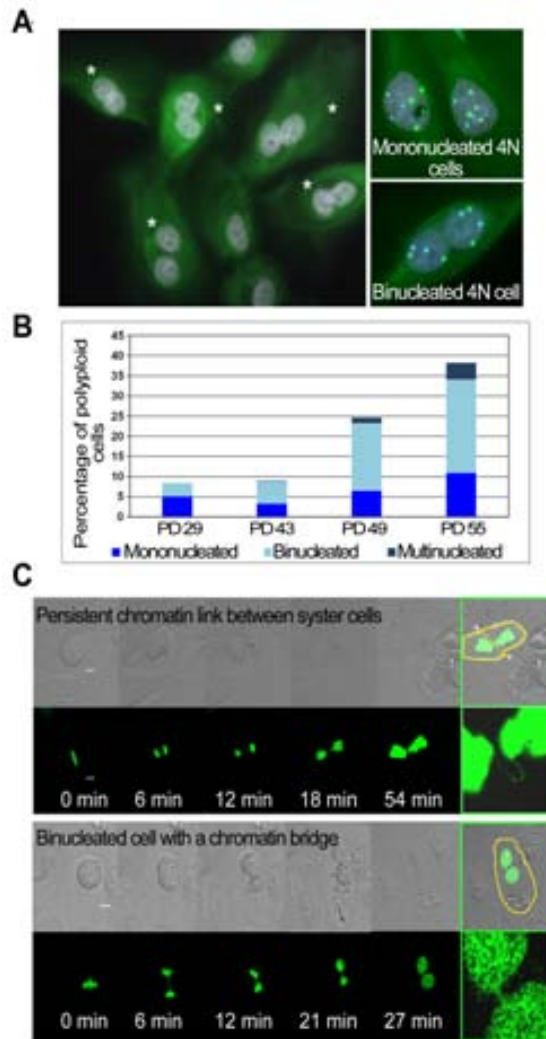


Figure 2. Polyploid cells caused by incomplete cytokinesis (A) Immunofluorescence of alpha and beta-tubulin and DAPI staining allows binucleated (asterisks) to be distinguished from mononucleated HMECs (left image). ImmunoFISH revealed two tetraploid cells each with a single 4N nucleus (top right), and a tetraploid cell containing two 2N nuclei within the same cytoplasm (down right). (B) Averaged percentage of mononucleated, binucleated and multinucleated polyploid HMECs throughout the cell culture from two different experiments. Detailed values are given in ST2. (C) Time-lapse micrographies of H2B-GFP transfected HMECs entering metaphase, $t=0$ min. Anaphase onset manifested by the presence of an anaphase bridge which is progressively strengthened but remains unbroken connecting the two nuclei (see inset) up to early G1 (upper images). Follow up of an H2B-GFP HMEC in which the anaphase bridge remains unbroken (inset) coupled to the binucleation process (lower images). The plasma membrane is emphasized with a yellow line

(Shimizu et al., 2005). Therefore, it is feasible to hypothesize that the longer the chromatin between the two centromeres, the more capacity the bridge has to withstand tension; thus, these

bridges have more chance of remaining unbroken and of therefore being able to obstruct cytokinesis. To check this possibility, we measured intercentromeric distances of unstable chromosomes in metaphase plates with the *Micromeasure* software. In diploid cells we recorded intercentromeric distances for all the dicentric and trivalent chromosomes observed. However, in 4N and 8N cells we only considered the unstable rearrangements that were duplicated in the polyploid chromosome set. This scoring avoids considering unstable chromosomes that arise in the latest G1 phase, and which are therefore unrelated to the genesis of polyploidy. In addition, as each metaphase has different degrees of chromosome compaction, we normalized the individual values obtained by considering the length of chromosome 1 in Megabase pairs (Mbp) in each metaphase plate (Figure 3A). In total, we took the intercentromeric distance of 95 and 35 duplicated unstable chromosomes from 46 tetraploid (Figure 3B) and 9 octoploid metaphase spreads, which on average were 120.3 Mbp and 141.9 Mbp in length respectively. These two values are higher than the average of 104.7 Mbp obtained from the 119 scored unstable single chromosomes in 74 diploid metaphases (ANOVA, $p < 0.05$) (Figure 3C). Taken together, the enrichment of unstable chromosomes with the largest intercentromere distances in tetraploid and octoploid metaphase spreads indicates that the longer the chromatin between the two DNA complements the higher the probability of the cell becoming polyploid.

Amplification of centrosomes results in highly unstable polyploid progeny

Failure to complete cytokinesis can generate polyploid cells with twice the number of normal centrosomes, which can lead to high rates of chromosome missegregation. Nevertheless, it has been suggested that the loss of p16^{INK4a} in HMECs directly generates supernumerary centrosomes by centriole pair splitting, independently of cell polyploidization (McDermott et al., 2006). To clarify this issue, we combined immunostaining procedures using antibodies against pericentrin, which allow centrosomes to be scored in each cell, with centromeric FISH techniques for two different chromosomes, to ascertain their ploidy status. The frequency of interphase cells with more than two centrosomes increased from 0.9% at PD29 to 14.8% at PD55 (Figure 4A). It is important to note that the majority of cells with supernumerary centrosomes (83%) also had abnormal numbers of chromosome sets. Therefore, rather than a direct consequence of p16^{INK4a} silencing, our results

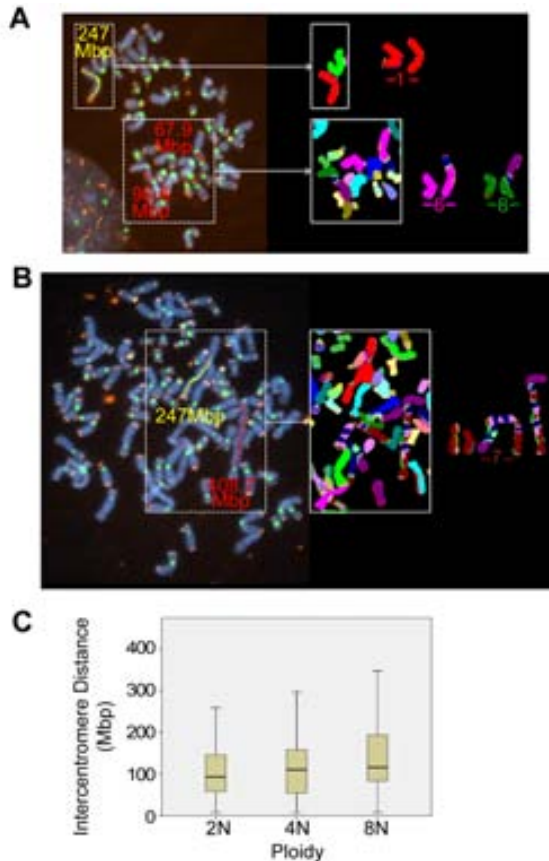


Figure 3. Enrichment of unstable chromosomes with long intervening chromatin in polyploid HMECs.

(A) Intercentromeric distances of all dicentric chromosomes in diploid metaphases were measured (red line) using specialized software. They were normalized in megabase pairs (Mbp) using the known length of chromosome 1 (yellow line). (B) Duplicated dicentric chromosomes were first identified using M-FISH in tetraploid and octoploid metaphases. Their intercentromeric distances were measured (red line) and also normalized in Mbp in relation to chromosome 1 (yellow line). (C) Box plot in which the height of the thicker bar indicates the mean of the intercentromeric distances. The vertical line represents standard deviation.

point to polyploidization as the main mechanism for acquiring extra centrosomes in HMECs.

The expected consequence of a proliferative cell having supernumerary centrosomes is the orchestration of multipolar mitosis, unless centrosomes are either functionally silenced or clustered into two functional pools to form a pseudobipolar spindle (Quintyne et al., 2005; Basto, 2008). In order to ascertain if supernumerary centrosomes in HMECs lead to the segregation of chromosomes to three or more poles, we investigated the arrangement of extra centrosomes in mitotic cells. During early mitosis, prometaphase and metaphase cells exhibiting

more than 2 centrosomes organized either pseudobipolar or multipolar spindles with equal frequencies. Cross-shaped or lineal metaphase plates were observed along with the abnormal number of centrosomes (Figure 4B). In contrast, most ana-telophases with extra centrosomes (97%) assembled to arrange pseudobipolar spindles (Figure 4B). Only a limited number of the cells divided in a multipolar fashion and produced multinucleated cell progeny (Figure 2B). As a whole, HMECs mainly clustered supernumerary centrosomes into two poles, thus limiting multipolar cell division and preventing massive chromosome missegregation that might compromise the cell viability of daughter cells.

It has recently been reported that tetraploid cells with clustered centrosomes display a significantly increased frequency of missegregating chromosomes compared to matched diploids. Extra centrosomes force cells to pass through a multipolar spindle intermediate that promotes the formation of merotelic attachments that lead to increased aneuploidy levels (Ganem et al., 2009; Silkworth et al., 2009). In order to evaluate the extent of chromosome instability in diploid and tetraploid HMECs, we measured whole chromosome aneuploidy using centromeric oligoFISH for four chromosomes in interphase nuclei. This analysis showed that a high proportion of cells in the tetraploid subpopulation showed whole chromosome gains and losses, and this frequency was nearly 3.5 times higher than that observed in the 2N HMECs (54% vs 16% aneuploid cells respectively; Student t test, $p < 0.05$) (Figure 4C). This increase in aneuploidy is probably related to the supernumerary centrosomes shown by tetraploids. However, polyploid HMECs present a telomere dysfunction background which, in addition to the aneuploidy generated by extra centrosomes, can culminate in the formation of structural chromosome aberrations. By analyzing chromosome reorganizations using pancentromeric and pantelomeric PNA-probes along with M-FISH protocols we found that tetraploid cells accumulated a markedly higher proportion of structural chromosome abnormalities than matched diploids (7.4 vs 2.3 abnormalities/cell respectively; Student t test, $p < 0.05$) (Figure 4D). Reciprocal and non-reciprocal translocations, dicentric chromosomes, chromosome amplifications and/or terminal deletions and chromosome fragments, prevailed in 4N metaphases with respect to diploids (Figure 4E). Overall, our results show that the emergence of tetraploid cells with supernumerary centrosomes in a telomere dysfunctional environment

promotes highly unstable cells that show both whole and segmental chromosome aberrations, which are hallmarks of cancer cells.

Discussion

Our study links for the first time epithelial cell polyploidization and telomere dysfunction in human cells, and provides a basis for the appearance of highly unstable genomes that show both structural and numerical CIN, as well as the large-scale changes in chromosome numbers that characterize epithelial cell transformation.

Physiological telomere erosion-dependent tetraploidization

Different mechanisms could be behind the genesis of tetraploid cells, but in the context of telomere dysfunction, endoreduplication cycles have been proposed as a general mechanism for the induction of tetraploidy in early stages of tumorigenesis (Davoli et al., 2010). These authors reported that p53-deficient mouse embryonic fibroblasts depleted of POT1a/b show an extended G2 phase and eventually bypass mitosis, which results in whole-genome reduplication. A persistent DNA damage response is observed in this cell system because uncapped telomeres are not repaired (Hockemeyer et al., 2006). However, in humans under physiological conditions, age-dependent telomere erosion, rather than leading to an overwhelming accumulation of uncapped telomeres, leads to the gradual appearance of unprotected chromosome ends that are continuously repaired by fusing with each other. This circumstance also occurs in cells of individuals with telomere-shortening syndromes, such as Dyskeratosis Congenita (Armanios, 2009), although at an accelerated rate.

The HMEC model is a valuable system for studying telomere-dependent chromosome instability. Spontaneous p16^{INK4a} promoter hypermethylation allows cells with critically short telomeres to proliferate and leads to the continuous accumulation of chromosome aberrations and massive genomic instability (Romanov et al., 2001; Soler et al., 2005). Our findings are consistent with the idea that progressive telomere shortening engenders tetraploidy through cytokinesis failure owing to persistent chromatin bridges that disturb the progression of cleavage furrow. The presence of bulk chromatin (Mullins and Biesele, 1977) trapped under the cleavage furrow results in

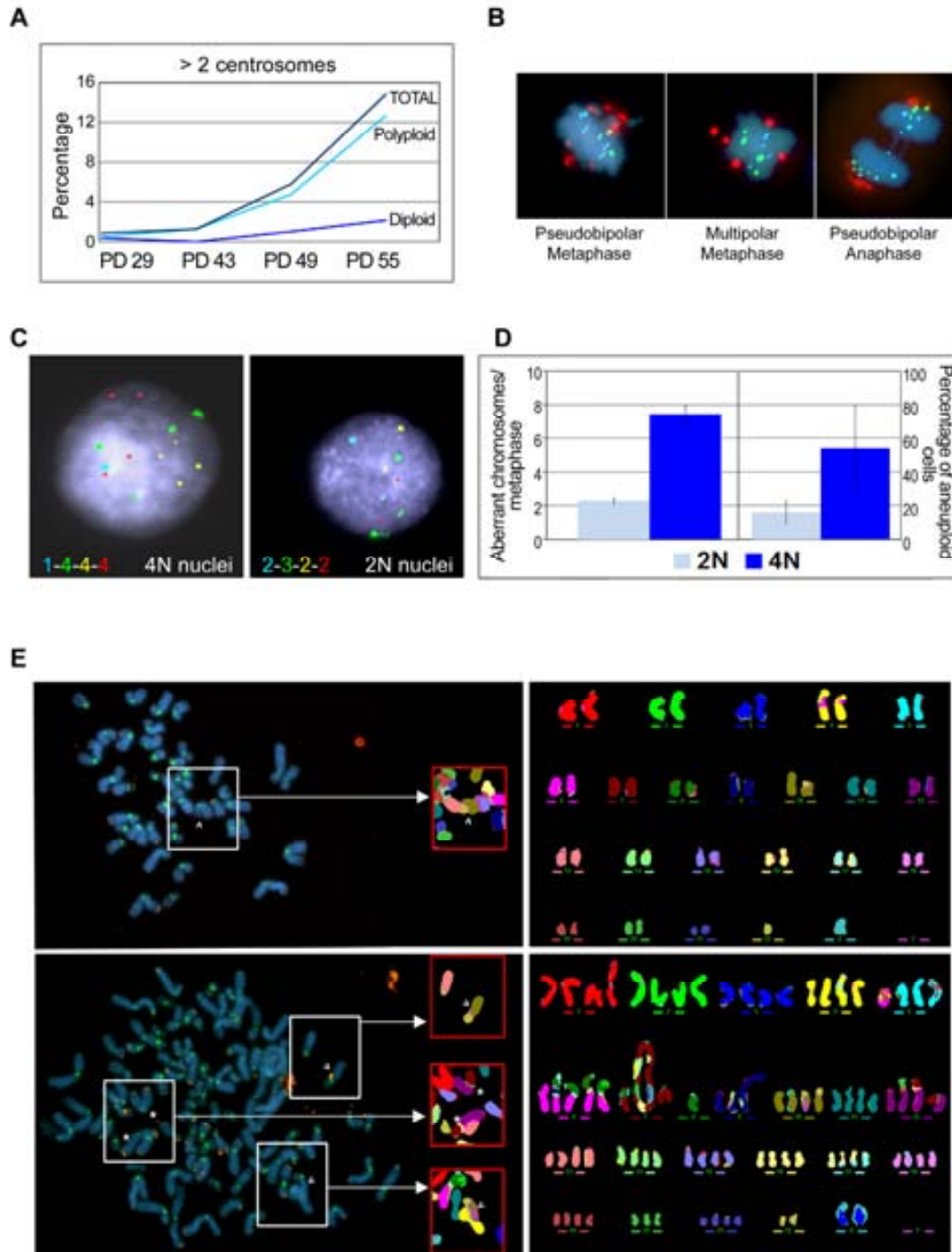


Figure 4. Increased chromosome instability in polyploid HMECs. (A) Increase in diploid and polyploid HMECs exhibiting more than two centrosomes throughout the culture. (B) Representative images of tetraploid mitosis identified by means of centromeric specific FISH (four blue and four green signals each) showing more than two centrosomes (red dots). Line shaped metaphase exhibiting supernumerary centrosomes grouped in a pseudobipolar manner (*left*). Cross shaped metaphase with multiple poles (*middle*). Anaphase cell with amplified centrosomes, in which the two chromatin bulks are segregating into two poles (*right*). (C) FISH analysis of tetraploid (*left*) and diploid (*right*) HMECs, using centromeric oligoFISH probes for chromosomes 4 (red), 6 (blue), 9q12 (green) and 12 (yellow). (D) Frequency of structural abnormalities per metaphase and percentage of aneuploid cells in diploid and tetraploid populations at late PDs. Data are shown as the mean \pm SD from two and four independent experiments respectively. (E) Pancentromeric and pantelomeric PNA hybridization and consecutive M-FISH of diploid (*upper images*) and tetraploid (*lower images*) metaphase spreads at the same PD, illustrating different types of chromosome reorganizations. Arrowheads indicate a non-reciprocal translocations (NRT) between chromosomes 10 and 22, while the asterisk indicates a NRT between chromosomes 7 and 12.

tetraploid cells. Here we show that cytokinesis failure also arises when chromatin bridges resulting from excessive telomere shortening resist the pulling tension without breaking or losing their connection with the spindle poles. It has already been demonstrated that chromatin breakage is the main mode of anaphase bridge resolution in different cell types, including HMECs (Hoffelder et al., 2004; Shimizu et al., 2005; Titen and Golic, 2008; Pampalona et al., 2010a), and that a small portion of unbroken chromatin bridges can segregate erroneously during mitosis between daughter HMECs causing whole chromosome aneuploidy (Pampalona et al., 2010b). Moreover, we further hypothesize that while chromatin bridges with short intervening chromatin are initially overstretched and finally break during anaphase, those with longer intervening chromatin may resist the pulling tensions and remain unbroken until G1. The bridged chromatin spanning the cleavage plane would ultimately induce furrow retraction and promote the emergence of binucleated polyploid cells with extra centrosome copies.

The consequences of tetraploidization associated with telomere dysfunction

Mechanisms leading to polyploidy are inherently linked to centrosome number abnormalities. One of the consequences of cells having twice the number of centrosomes is the formation of multipolar spindles that are rarely compatible with cell survival due to major genetic imbalances in daughter cells (Brinkley, 2001). However, the vast majority of tetraploid HMECs analyzed here assembled pseudobipolar spindles that eventually yielded two viable mononuclear 4N cells. Coalescence of multipolar spindles into bipolarity may favor unresolved merotelic attachments, a phenomenon that has recently been defined as the mechanism underlying the increase in numerical CIN in tetraploid cells (Ganem et al., 2009; Silkworth et al., 2009). In agreement with these observations, the analysis of gains and losses in tetraploid HMECs demonstrated a higher degree of chromosome missegregation with respect to the diploid counterparts. While aneuploidy might hamper proliferation of diploid cells (Williams et al., 2008; Thompson and Compton, 2008), it has been determined that doubling the chromosome content efficiently buffers the deleterious effect of steady-state missegregation generated by centrosome clustering (Ganem et al., 2007). These long lasting 4N cells would more readily manifest the genetic changes that might lead to transformation.

Several lines of evidence support the idea that the proliferation of unstable tetraploids gradually generates subtetraploid lineages of cells that might contribute to carcinogenesis. In humans, the sequence of tetraploidization and chromosome loss commonly occurs in human solid tumors *in vivo* and has been associated with tumor progression (Shackney et al., 1989; Dutrillaux et al., 1991; Levine et al., 1991). However, coupled to numerical CIN, tetraploid cells in early cancer lesions accumulate increased amounts of structural chromosome abnormalities. Proliferation of unstable tetraploid intermediates generated by excessive telomere erosion might explain this observation. Here we show that human epithelial cells with an already present telomere dysfunction associated structural (Romanov et al., 2001; Soler et al., 2005; Tusell et al., 2008) and numerical CIN (Pampalona et al., 2010b), can undergo further instability due to cytokinesis failure, which gives rise to polyploid cells. Ultimately, the cumulative effect of centrosome-clustering induced aneuploidy on the preceding unstable polyploids might lead to the accumulation of highly CIN genomes, which might alter the dose of cancer-relevant genes.

In light of our results, we conclude that telomere dysfunction through BFB-cycles is a major force underlying the accumulation of structural and numerical imbalances and most importantly ploidy defects that can promote the formation of highly unstable genomes and contribute to the initiation of human carcinogenesis.

Material and Methods

Cells and culture conditions

HMECs were derived from normal breast tissue of two independent donors and were purchased from BioWhittaker (Walkersville, MD) and Cell Applications Inc. (San Diego, CA). Cells were cultured in a Human Mammary Epithelial Cell Growth Medium Kit (Cell Applications) at a temperature of 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The number of accumulated PDs per passage was determined using the equation $PD = PD_{initial} + \log(n^{\circ} \text{ viable cells harvested} / n^{\circ} \text{ viable cells plated}) / \log 2$.

Metaphase chromosome preparations

Metaphase spreads were obtained by means of treatment with colcemid 0.02µg/ml for 8 hours, followed by hypotonic shock and methanol/acetic fixation. Cell suspensions were dropped onto clean slides, which were stored at -20°C. The slides were mounted with 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. Metaphase

karyotyping at early PDs was performed by reverse DAPI staining, which results in a reproducible G band-like pattern that allows individual chromosomes to be identified accurately. M-FISH techniques (detailed below) were also applied in order to identify highly reorganized chromosomes. *Chromosome measures*: Chromosome measurements were taken by means of the MicroMeasure software version 3.01 (available at <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>). The distance between centromeres in rearranged chromosomes was normalized in base-pair values in each metaphase spread by comparing it with the known length of an intact chromosome (usually chromosome 1) obtained from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map.cgi?TAXID=9606&MAPS=ideogr.cntg_r.uqHs.genes&CHR=1.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) and combined Immunofluorescence-FISH

PNA-FISH: Centromeres and telomeres were labeled on metaphase spreads by means of PNA-FISH techniques using a Cy3-(CCCTAA)₃ PNA-probe for telomeres and a FITC-AAACACTCTTTTGTAGA PNA-probe for centromeres (PE Biosystems; Foster City, CA), as previously described (Martín et al., 2003). **Telomere dysfunction**: Pantelomeric probes allowed us to determine the chromosome arms that had signal-free telomeres (SFT). The SFT rate was obtained by dividing the number of chromosome arms without a telomere signal by the number of scored metaphases at each PD analyzed.

OligoFISH: A four color probe panel (Cellay Inc.; Cambridge, MA) that detects the centromeric region of chromosomes 4 (locus D4Z1), 6 (locus D6z1) and 12 (locus D12Z1), and a region located close to the centromere of chromosome 9 (9q12, satellite III at 9qh) was applied to the slides. The resulting signals were red, light blue, gold and green for chromosomes 4, 6, 12 and 9 respectively. Before hybridization, the slides were pre-treated with pepsin (0.1 mg/ml, Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) in 10 mM HCl and postfixed in 37% formaldehyde in PBS-1M MgCl₂. The in situ procedure followed the manufacturer's instructions.

M-FISH: To achieve a distinctive color signature for each metaphase chromosome, M-FISH probes (Abbott Laboratories; Abbott Park, IL) were applied after PNA-FISH hybridization. Slides were rinsed in 2xSSC until the coverslip fell off, then dehydrated in ethanol series and allowed to dry. Next, the M-FISH protocol was

applied as previously described (Soler et al., 2005).

Immuno-FISH: HMECs seeded in chamber slides were grown until 70% confluence was reached. Fixation was carried out with cold methanol for 10 minutes. Cells were then permeabilized in 1xPBS-1%TritonX100 solution. The blocking step was carried out with 1xPBS-0.1%Tween20-2%Fetal Calf Serum for 1 hour at 37°C. Primary antibodies against centrosomes (rabbit anti-pericentrin, Abcam; UK) and microtubules (mouse anti alpha and beta-tubulin; Sigma-Aldrich) were diluted with blocking solution at final concentrations of 1:2000 and 1:500 respectively. Secondary antibodies were anti-mouse Alexa-488 and anti-rabbit Alexa-568 (both at 1:500, Molecular Probes; Life Technologies, Carlsbad, CA). Three rounds of washes with blocking solution were performed after each antibody incubation. Next, the FISH protocol was applied using a mixture of centromeric DNA probes specific for chromosomes 4 (CEP4; SpAqua) and 18 (CEP18; SpGreen) (Abbott), as previously described (Pampalona et al., 2010b).

Finally, all slides were dehydrated and mounted in antifade solution containing DAPI, before proceeding to the microscopic analysis. Fluorescent signals were visualized under an Olympus BX60F5 epifluorescent microscope equipped with epifluorescent optics specific for each fluorochrome. Capture and analysis was carried out with the Cytovision platform (Genetix, UK).

Flow Cytometry

Sub-confluent HMECs were collected and fixed with ethanol 70% and kept at -20°C until analysis. Permeabilization was performed with 1xPBS-1%TritonX100 solution. The primary antibody Cyclin D1 (1:100, Abcam) and anti-rabbit Alexa-488 (1:500; Molecular Probes) were applied using standard procedures that have been described previously (Juan and Darzynkiewicz, 2001). Before acquiring the samples, they were counterstained with 0.5% Propidium Iodide (1mg/ml) in 1xPBS-0.1%TritonX100 containing 0.2 mg/ml RNAase A DNAase-free (Sigma-Aldrich). Cell cycle analysis was performed in a FACSCalibur and analyzed with the BDFacsDiva software (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ). In order that the cytometer did not record two different cells as one event, which would result in false polyploid HMECs, doublet cells were gated out using a width-FL2/area-FL2 plot.

Transfection procedures and live cell imaging

The day before transfection, HMECs were plated

onto a 35-mm glass bottom dish (MatTek, Ashland, MA) at a density of 7300 cells/cm². Transfection procedures using a pEGFP-N1 plasmid encoding H2B-GFP sequence (BD Biosciences) were performed using Fugene HD (Roche Diagnostics S.L.; Indianapolis, IN) according to manufacturer's instructions. Live cell imaging was performed with a Leica TCS SP5 confocal microscope. Cells were visualized with a HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV objective using the 488nm line from an argon laser. Mitotic cells were imaged in a 3x zoom using the software Leica LAS AF Lite (Leica Microsystems, Inc., Germany) for up to 5 hours, at intervals of 3 minutes. Acquisition settings were established to 10% laser power through a pinhole of 5 AU, a line average of 2, and a scan speed of 400Hz to avoid excessive cellular damage. Throughout the whole process, cells were kept at 37°C and 5%CO₂. For long-term analysis, nontransfected cells were tracked from mitosis to interphase with a dry 10x brightfield objective. Images were acquired every 5 minutes during a period of 10 hours.

Statistical analysis

A Student t test was used to compare two groups of values; alternatively, a Mann-Whitney analysis was used when values did not follow a normal distribution. Analysis of variance (ANOVA) was applied to compare frequencies and ploidy differences throughout the PDs, when 3 or more groups of data were contrasted. The correlation was calculated according to the Spearman rank correlation coefficient. A p value of less than 0.05 was considered to be significant.

Acknowledgments

We thank the Language Advisory & Translation Unit (SiMTRAD) at the *Universitat Autònoma de Barcelona* Language Service for editing the manuscript. J.Pampalona is a recipient of a grant from the *Generalitat de Catalunya* (2009FIC00063). This work was supported by grants from the *Consejo de Seguridad Nuclear; Instituto de Salud Carlos III*, Grant number RD06/0020/1020 and *Generalitat de Catalunya*, Grant number 2009SGR-282.

References

Armanios, M. (2009). Syndromes of telomere shortening. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 10, 45-61.
 Artandi, S., Chang, S., Lee, S., Alson, S., Gottlieb, G., Chin, L., and DePinho, R. (2000). Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 406, 641-645.
 Basto, R. (2008). Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies. *Cell* 133, 1032-1042.

Boveri, T. (2008). Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J Cell Sci* 121 Suppl 1, 1-84.
 Brinkley, B.R. (2001). Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol* 11, 18-21.
 Davoli, T., Denchi, E., and de Lange, T. (2010). Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy. *Cell* 141, 81-93.
 Dutrillaux, B., Gerbault-Seureau, M., Remvikos, Y., Zafrani, B., and Prieur, M. (1991). Breast cancer genetic evolution: I. Data from cytogenetics and DNA content. *Breast Cancer Res Treat* 19, 245-255.
 Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., Ivanova, E., Bronson, R., and Pellman, D. (2005). Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 437, 1043-1047.
 Galipeau, P., Cowan, D., Sanchez, C., Barrett, M., Emond, M., Levine, D., Rabinovitch, P., and Reid, B. (1996). 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7081-7084.
 Ganem, N., Godinho, S., and Pellman, D. (2009). A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 460, 278-282.
 Ganem, N., Storchova, Z., and Pellman, D. (2007). Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17, 157-162.
 Hockemeyer, D., Daniels, J., Takai, H., and de Lange, T. (2006). Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell* 126, 63-77.
 Hoffelder, D., Luo, L., Burke, N., Watkins, S., Gollin, S., and Saunders, W. (2004). Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma* 112, 389-397.
 Houchmandzadeh, B., Marko, J., Chatenay, D., and Libchaber, A. (1997). Elasticity and structure of eukaryote chromosomes studied by micromanipulation and micropipette aspiration. *J Cell Biol* 139, 1-12.
 Juan, G., and Darzynkiewicz, Z. (2001). Bivariate analysis of DNA content and expression of cyclin proteins. *Curr Protoc Cytom* Chapter 7, Unit 7.9.
 Juan, G., Gong, J., Traganos, F., and Darzynkiewicz, Z. (1996). Unscheduled expression of cyclins D1 and D3 in human tumour cell lines. *Cell Prolif* 29, 259-266.
 Lazzarini Denchi, E., Celli, G., and de Lange, T. (2006). Hepatocytes with extensive telomere deprotection and fusion remain viable and regenerate liver mass through endoreduplication. *Genes Dev* 20, 2648-2653.
 Lengauer, C., Kinzler, K., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
 Levine, D., Sanchez, C., Rabinovitch, P., and Reid, B. (1991). Formation of the tetraploid intermediate is associated with the development of cells with more than four centrioles in the elastase-simian virus 40 tumor antigen transgenic mouse model of pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6427-6431.
 Maley, C. (2007). Multistage carcinogenesis in Barrett's esophagus. *Cancer Lett* 245, 22-32.
 Martín, M., Genescà, A., Latre, L., Ribas, M., Miró, R., Egozcue, J., and Tusell, L. (2003). Radiation-induced chromosome breaks in ataxia-telangiectasia cells remain open. *Int J Radiat Biol* 79, 203-210.

Mayer, V., and Aguilera, A. (1990). High levels of chromosome instability in polyploids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 231, 177-186.

McDermott, K., Zhang, J., Holst, C., Kozakiewicz, B., Singla, V., and Tlsty, T. (2006). p16(INK4a) prevents centrosome dysfunction and genomic instability in primary cells. *PLoS Biol* 4, e51.

Meeker, A., Hicks, J., Gabrielson, E., Strauss, W., De Marzo, A., and Argani, P. (2004a). Telomere shortening occurs in subsets of normal breast epithelium as well as in situ and invasive carcinoma. *Am J Pathol* 164, 925-935.

Meeker, A., Hicks, J., Iacobuzio-Donahue, C., Montgomery, E., Westra, W., Chan, T., Ronnett, B., and De Marzo, A. (2004b). Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 10, 3317-3326.

Mendoza, M., Norden, C., Durrer, K., Rauter, H., Uhlmann, F., and Barral, Y. (2009). A mechanism for chromosome segregation sensing by the NoCut checkpoint. *Nat Cell Biol* 11, 477-483.

Mullins, J., and Biesele, J. (1977). Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells. *J Cell Biol* 73, 672-684.

Musarò, M., Ciapponi, L., Fasulo, B., Gatti, M., and Cenci, G. (2008). Unprotected *Drosophila melanogaster* telomeres activate the spindle assembly checkpoint. *Nat Genet* 40, 362-366.

Nigg, E.A. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nature Rev Cancer* 2, 815-825.

Norden, C., Mendoza, M., Dobbelaere, J., Kotwaliwale, C., Biggins, S., and Barral, Y. (2006). The NoCut pathway links completion of cytokinesis to spindle midzone function to prevent chromosome breakage. *Cell* 125, 85-98.

Olaharski, A., Sotelo, R., Solorza-Luna, G., Gonsebatt, M., Guzman, P., Mohar, A., and Eastmond, D. (2006). Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis* 27, 337-343.

Pampalona, J., Soler, D., Genescà, A., and Tusell, L. (2010a). Telomere dysfunction and chromosome structure modulate the contribution of individual chromosomes in abnormal nuclear morphologies. *Mutat Res* 683, 16-22.

Pampalona, J., Soler, D., Genescà, A., and Tusell, L. (2010b). Whole chromosome loss is promoted by telomere dysfunction in primary cells. *Genes Chromosomes Cancer* 49, 368-378.

Quintyne, N.J., Reing, J.E., Hoffelder, D.R., Gollin, S.M., and Saunders, W.S. (2005). Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science* 307, 127-129.

Romanov, S., Kozakiewicz, B., Holst, C., Stampfer, M., Haupt, L., and Tlsty, T. (2001). Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature* 409, 633-637.

Shackney, S., Smith, C., Miller, B., Burholt, D., Murtha, K., Giles, H., Ketterer, D., and Pollice, A. (1989). Model for the genetic evolution of human solid tumors. *Cancer Res* 49, 3344-3354.

Shimizu, N., Shingaki, K., Kaneko-Sasaguri, Y., Hashizume, T., and Kanda, T. (2005). When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Exp Cell Res* 302, 233-243.

Silkworth, W., Nardi, I., Scholl, L., and Cimini, D. (2009). Multipolar spindle pole coalescence is a major source of kinetochore mis-attachment and chromosome mis-segregation in cancer cells. *PLoS One* 4, e6564.

Sluder, G., and Nordberg, J.J. (2004). The good, the bad and the ugly: the practical consequences of centrosome amplification. *Curr Opin Cell Biol* 16, 49-54.

Soler, D., Genescà, A., Arnedo, G., Egozcue, J., and Tusell, L. (2005). Telomere dysfunction drives chromosomal instability in human mammary epithelial cells. *Genes Chromosomes Cancer* 44, 339-350.

Steigemann, P., Wurzenberger, C., Schmitz, M.H., Held, M., Guizzetti, J., Maar, S., and Gerlich, D.W. (2009). Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell* 136, 473-484.

Storchova, Z., and Kuffer, C. (2008). The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *J Cell Sci* 121, 3859-3866.

Storchova, Z., and Pellman, D. (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 45-54.

Storchová, Z., Breneman, A., Cande, J., Dunn, J., Burbank, K., O'Toole, E., and Pellman, D. (2006). Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. *Nature* 443, 541-547.

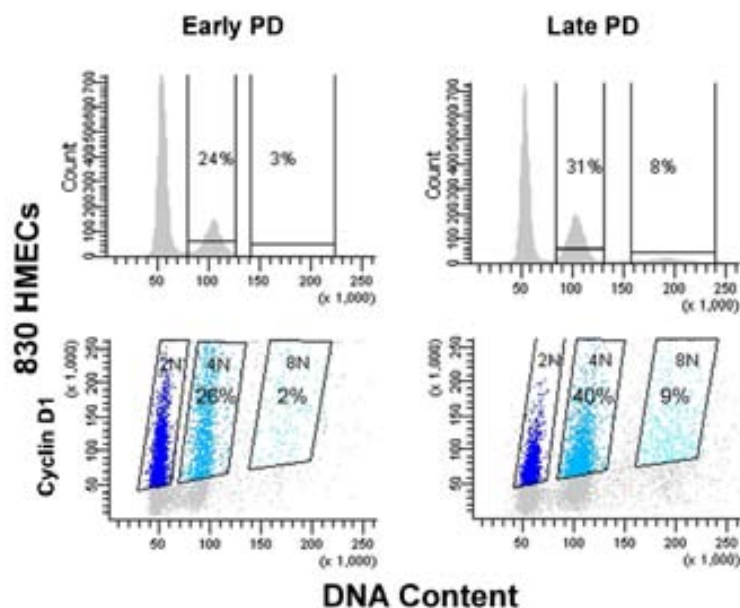
Thompson, S.L., and Compton, D.A. (2008). Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. *J Cell Biol* 180, 665-672.

Titen, S., and Golic, K. (2008). Telomere loss provokes multiple pathways to apoptosis and produces genomic instability in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 180, 1821-1832.

Tusell, L., Soler, D., Agostini, M., Pampalona, J., and Genescà, A. (2008). The number of dysfunctional telomeres in a cell: one amplifies; more than one translocate. *Cytogenet Genome Res* 122, 315-325.

Williams, B., Prabhu, V., Hunter, K., Glazier, C., Whittaker, C., Housman, D., and Amon, A. (2008). Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. *Science* 322, 703-709.

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 1. Telomere-dependent polyploidization in 830 HMECs

Flow cytometry analysis of DNA content of 830 HMECs stained with propidium iodide, at two different PDs (*upper panels*). The percentage of cells with 4N and 8N DNA content is given. Bivariate analysis of DNA content and expression of cyclin D1 protein (*lower panels*), in which cyclin D1 positive cells are grouped depending on their ploidy status. Corresponding percentages are indicated.

Supplemental Tables

Supplemental Table 1. Correlation of SFT (signal-free telomere) chromosomes per metaphase with tetraploidy levels at different PDs for two distinct donors

Donor	PD	Metaphases	SFT per metaphase	Tetraploid cells (%)
830	25	440	3.05±1.39	11 (2.50%)
	42	283	8.04±2.73	52 (18.37%)
219-7	25	356	1.86±1.15	11(3.09%)
	36	473	3.77±1.70	22 (4.65%)
	39	109	4.03±1.39	7 (6.42%)
	43	993	3.71±1.36	87 (8.76%)
	59	363	7.26±2.15	48 (13.22%)

Supplemental Table 2. Analysis of the number of nuclei per cytoplasm in polyploid cells throughout the cell culture

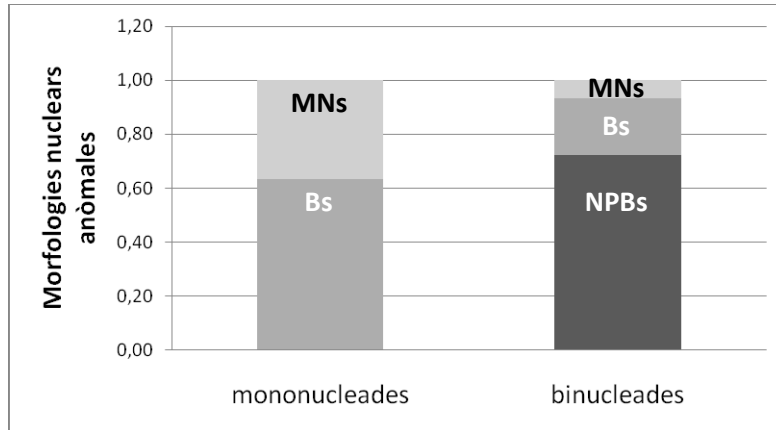
PD	Mononucleated	Binucleated	Multinucleated
29	5.1±0.3	3.3±0.7	--
43	3.3±1.2	5.5±1.3	0.1±0.2
49	6.4±1.2	16.7±2.6	1.3±0.4
55	10.9±1.3	23.1±3.7	4.2±0.43

Annex de Resultats



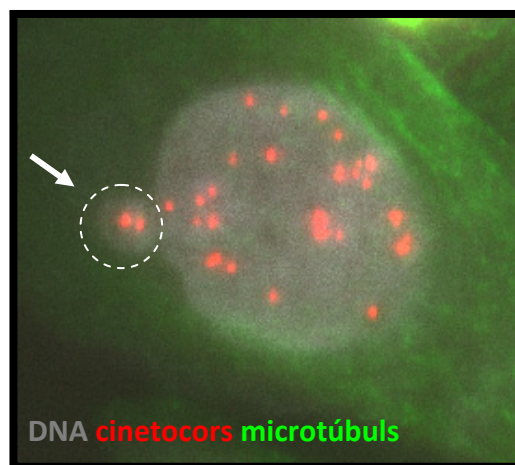
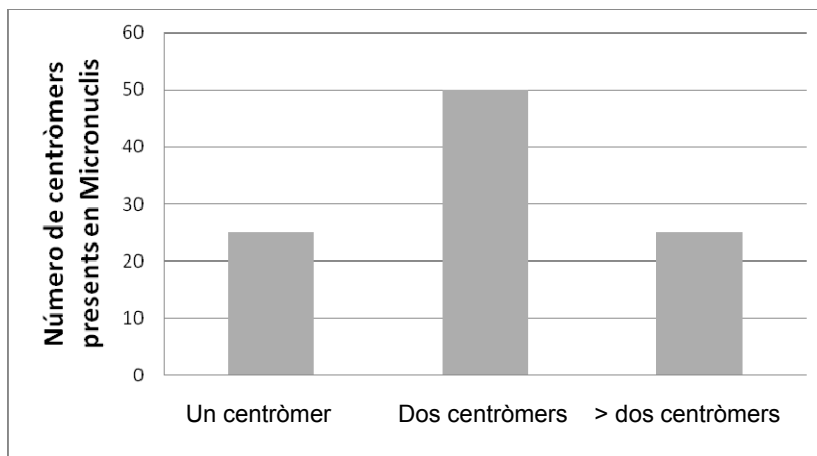
Annex Resultats 1 | Anomalies morfològiques nuclears: Mononucleades vs Binucleades

Tipus de morfologies nuclears anòmales (ANM) en HMECs mononucleades i binucleades. Les ANM exhibides per les cèl·lules obtingudes amb citocalasina B mostraren micronuclis (MNs), protuberàncies nuclears (Bs) i ponts nucleoplasmàtics (NPBs). En canvi quan es deixava completar la citocinesi (mononucleades) les ANS observades són bàsicament de tipus MNs i Bs.



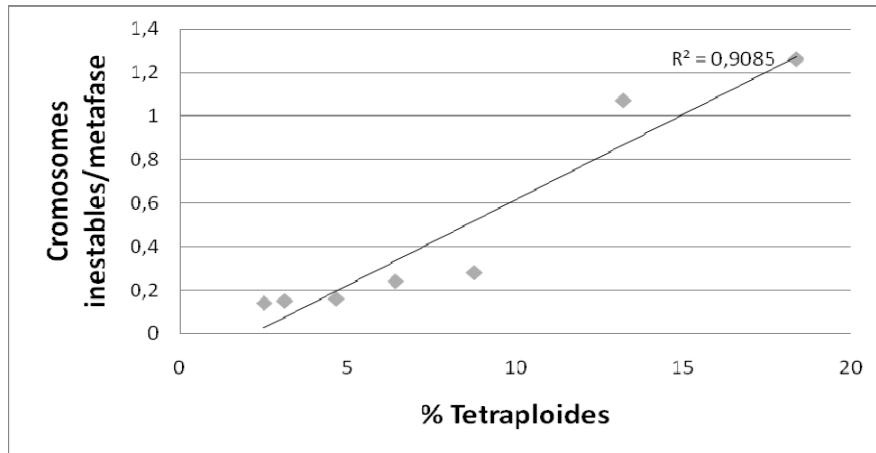
Annex Resultats 2 | Presència de centròmers en micronuclis

La presència de senyals centromèrics als micronuclis de les HMECs denota el seu origen. La presència d'un centròmer pot ser indicatiu de la pèrdua anafàsica d'una cromàtide dicèntrica sencera o bé deguda a una porció d'un pont cromatínic que s'ha trencat. La presència de dos centròmers indica la segregació errònia d'una cromàtide dicèntrica (imatge). La presència de més de dos centròmers és indicatiu de segregacions anòmales de diverses cromàtides dicèntriques.



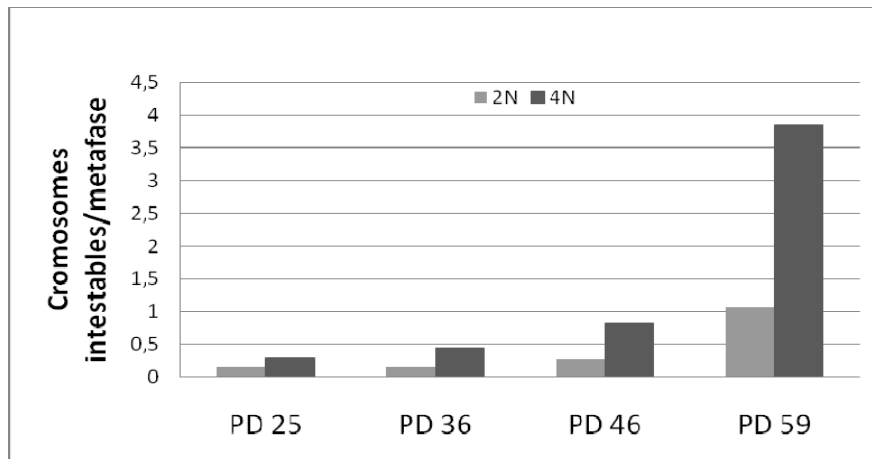
Annex Resultats 3 | Correlació entre la taxa de cèl·lules tetraploides i la presència de cromosomes inestables

La taxa de poliploidia obtinguda del recompte de metafases (Trellat IV, Supplementary Table1) exhibeix una correlació significativa amb la freqüència de cromosomes inestables mostrada per les metafases diploides (Correlació de Spearman, $p < 0.05$).



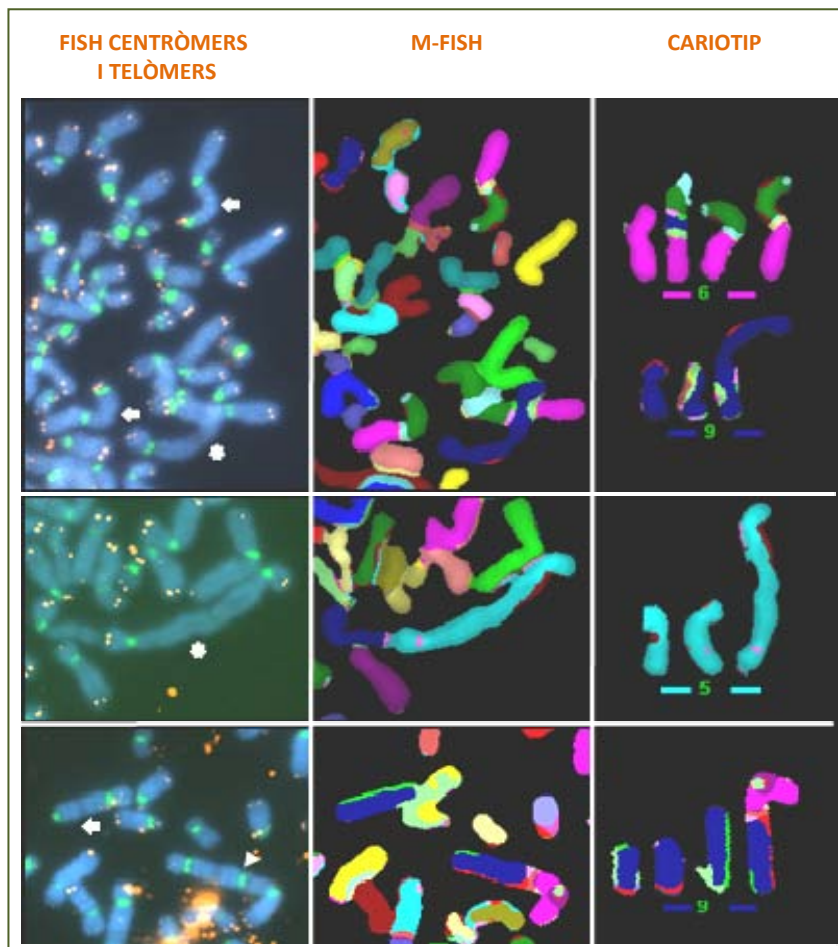
Annex Resultats 4 | Presència de cromosomes inestables en metafases diploides vs tetraploides

Freqüència de cromosomes potencialment inestables (dicèntrics, tricèntrics i anells) en metafases tetraploides (4N) i diploides (2N):

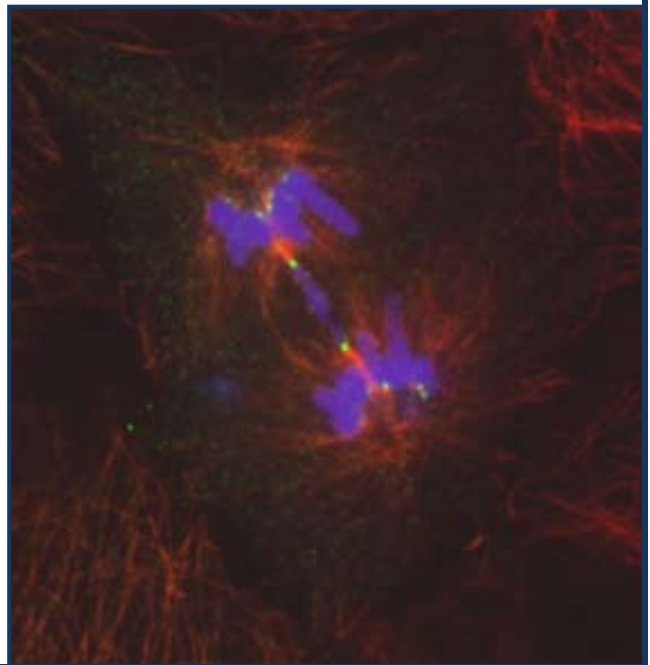


Annex Resultats 5 | Tipus de cromosomes dicèntrics heretats observats en metafases tetraploides

Les cèl·lules tetraploides mostraren tres tipus de cromosomes dicèntrics heretats. El primer tipus era resultat de la duplicació d'un cromosoma dicèntric (primera fila, fletxa). El segon tipus era el resultat d'una fusió entre cromàtides germanes (primera i segona fila, asterisc) i el tercer tipus era com el primer però un dels cromosomes dicèntrics repetits s'havia fusionat amb un altre cromosoma (tercera fila, fletxa i triangle):



Discussió



3.1 Disfunció telomèrica: a l'avantsala de l'aparició d'instabilitat cromosòmica

Els genomes de les cèl·lules tumorals exhibeixen un ventall d'anomalies diverses alhora que complexes. A nivell cel·lular una característica comú de les cèl·lules provinents de tumors sòlids és la presència de nuclis interfàsics amb morfologies anòmales i configuracions mitòtiques atípiques (com ponts anafàsics o mitosis multipolars) (Gisselsson et al., 2002; Jin et al., 2007; Lingle and Salisbury, 1999; Salisbury et al., 2004; Sato et al., 2001; Stewenius et al., 2005). A nivell de cariotip s'observen diferents tipus d'anomalies cromosòmiques estructurals, com ara translocacions recíproques i no recíproques, delecions, amplificacions i cromosomes dicèntrics, així com anomalies en el nombre de cromosomes que inclouen des de guanys i pèrdues d'uns pocs cromosomes (aneuploïdia) fins a duplicacions de tot el genoma (poliploïdia) (Mitelman Database: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>). Aquest nivell de reorganització genòmica és conseqüència de processos que promouen la instabilitat cromosòmica (CIN) durant la carcinogènesi. Un mecanisme que, de forma fisiològica succeeix en cèl·lules proliferants i que, duta a l'extrem, pot conduir a l'aparició de CIN és l'erosió telomèrica. De fet, molts estudis relacionen la carcinogènesi humana amb la presència de telòmers críticament curts i/o CIN causada per disfunció telomèrica (*vegeu apartat 1.3.4 Introducció*). I no només això, sinó que s'ha demostrat que la CIN resultant de la disfunció telomèrica és capaç de generar lesions pre-neoplàsiques *in vivo* (Blasco et al., 1997; Farazi et al., 2003; Rudolph et al., 1999; Rudolph et al., 2001), o conduir directament a l'aparició de tumors epitelials quan es combina amb defectes en p53 (Artandi et al., 2000), en ratolí. Tot plegat, situa a la disfunció telomèrica com un mecanisme capaç de promoure activament la carcinogènesi.

3.1.1 La disfunció telomèrica causa morfologies nuclears anòmales

En les HMECs la disfunció telomèrica apareix de forma progressiva a mesura que les cèl·lules proliferen (Romanov, 2001; Soler et al., 2005). Estudis previs han mostrat que la disfunció telomèrica en aquestes cèl·lules dóna lloc a S-CIN a causa de l'entrada de cromosomes dicèntrics en cicles de BFB. A conseqüència d'això, els cariotips de les HMECs acumulen alteracions cromosòmiques estructurals a mesura que proliferen.

La valoració de la CIN en HMECs mitjançant l'assaig CBMN, ha permès observar tres tipus de morfologies nuclears anòmales principals: NPBs, Bs i MNs. Els models clàssics proposen un origen diferent per cadascuna de les morfologies (revisat per (Fenech, 2006). Els NPBs resultarien de cromosomes dicèntrics que han patit una torsió intercentromèrica i que al ser tibats cap a pols oposats del fus han originat un pont anafàsic. En canvi, els Bs s'ha proposat que apareixen com a resultat d'un mecanisme d'eliminar amplifícacions gèniques. La cèl·lula relegaria aquestes seqüències amplifícades a la perifèria nuclear i per mitjà d'un B transitori, serien excloses del nucli principal mitjançant la formació d'un micronucli (Ambros et al., 1997; Shimizu et al., 1998; Shimizu et al., 2000). Per contra, el seguiment a temps real de les HMECs transfectades amb H2B-GFP van permetre determinar que els Bs són una morfologia transitòria deguda al trencament dels ponts anafàsics més que a l'exclusió d'amplifícacions gèniques (**Treball I**). D'acord amb els nostres resultats, la morfologia nuclear anòmala majoritària en cèl·lules tractades amb citocalasina B (binucleades) foren els NPBs (**Treball I**), per contra, en les cèl·lules no tractades (mononucleades) la consecució de la citocinesi produí el trencament dels NPBs observant-se predominantment Bs i MNs (**Annex de resultats 1**). Pel que fa a l'origen dels MNs, el seguiment de les HMECs a temps real va permetre determinar que aquestes estructures apareixen quan els ponts anafàsics es trenquen per més d'un punt. De fet, això succeïa en les HMECs en un de cada quatre ponts anafàsics (**Treball I**). No obstant, la probabilitat de trencament dels ponts sembla variar en diferents estudis. En cèl·lules de carcinoma escamós de la cavitat oral es va determinar que els ponts anafàsics trencats generaven micronuclis en un 70% dels casos (Hoffelder et al., 2004). En canvi, en cèl·lules HeLa, la freqüència de formació de MNs és del 12.66% (Rao et al., 2008). Aquesta variabilitat en la taxa de formació de micronuclis podria ser conseqüència de característiques cromosòmiques diferents entre els diferents tipus cel·lulars. En resum, els resultats obtinguts mostren que el destí dels ponts anafàsics pot explicar, almenys en part, les morfologies nuclears anòmales exhibides per les BN-HMECs en la seva fase de post-selecció. En aquestes cèl·lules els ponts cromatínics que romanen íntegres donen lloc a NPBs, i quan els ponts es trenquen per un o més punts donen lloc a Bs i MNs, respectivament.

Si les morfologies nuclears anòmales exhibides per les BN-HMECs resulten de la fusió de cromosomes amb telòmers críticament erosionats, una major presència d'extrems telomèrics disfuncionals hauria de conduir a un increment de NPBs, Bs i MNs. L'anàlisi de

les BN-HMECs fixades mostrà que els NPBs i Bs incrementaven de forma significativa amb els PD, coincidint amb un escurçament telomèric progressiu. Malgrat això, els MNs, la morfologia nuclear anòmala minoritària en cèl·lules fixades (**Treball I, Figura 1B**), no mostraren un increment significatiu al llarg del cultiu de les BN-HMECs. Una possible explicació a aquesta situació ve donada pel tipus d'estructures cromosòmiques que poden generar MNs: fragments acèntrics i/o cromosomes retardats en la seva migració als pols. En les HMECs, la disfunció telomèrica dóna lloc a la fusió de cromosomes sencers generant cromosomes dicèntrics sols, és a dir, no acompanyats per fragments acèntrics. Això comporta que el recompte de MNs en ambients telomèrics disfuncionals, a diferència de quan s'indueix dany amb agents clastogènics o aneugènics, no permet obtenir un valor acurat dels nivells de CIN.

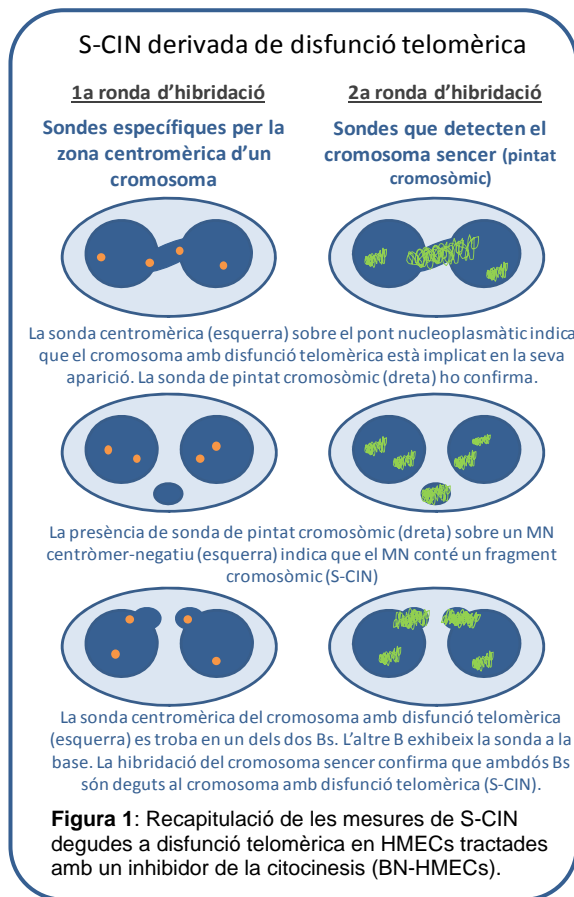
Tot i que els resultats apunten que les ANMs són resultat de la disfunció telomèrica que presenten les HMECs, per demostrar-ho de forma definitiva cal determinar si els cromosomes responsables de la seva aparició són també els que presenten extrems telomèrics disfuncionals. Estudis en cultius de cèl·lules derivades de tumors han establert una connexió entre la disfunció telomèrica i la presència de morfologies nuclears anòmales (Gisselsson, 2001). Però s'ha de considerar que les cèl·lules neoplàsiques presenten defectes genètics que presumptament podrien causar anomalies morfològiques nuclears de forma independent a la disfunció telomèrica. Per contra, les HMECs constitueixen un model "net" per analitzar la implicació dels cromosomes amb telòmers disfuncionals en les ANMs.

És la inestabilitat cromosòmica de les HMECs causada per disfunció telomèrica?

Per determinar si la disfunció telomèrica és responsable de generar anomalies morfològiques nuclears a les HMECs, es combinà el CBMN amb sondes de DNA específiques per a cromosomes amb un perfil telomèric normal i cromosomes amb telòmers de longitud crítica. Això implica, en primer lloc, determinar quin és el perfil telomèric dels cromosomes per a cadascuna de les línies de cèl·lules estudiades. D'acord amb estudis previs realitzats en el nostre laboratori, els primers extrems cromosòmics en quedar desprotegits durant el cultiu de les HMECs és un tret característic de cada donant (Soler et al., 2005). A mesura que les cèl·lules proliferen augmenta la taxa de disfunció telomèrica i nous extrems telomèrics esdevenen

disfuncionals (Soler et al., 2005). En el nostre estudi (**Treball I**), mitjançant l'anàlisi de la presència de senyals d'hibridació PNA Cy3-(CCCTAA)₃ en un mínim de 90 metafases es va poder determinar que els extrems telomèrics amb una major mancança de senyal a les HMECs estudiades eren el braç llarg del cromosoma 1 i el braç curt del cromosoma 22. A partir d'aquest resultat, se seleccionaren tres cromosomes, dos d'ells amb disfunció telomèrica -l'1 i el 22- i un cromosoma amb un perfil telomèric no crític -el cromosoma 4- el qual va ser escollit com a control (**Treball I, Figura 3A**).

La utilització de sondes centromèriques específiques per a aquests tres cromosomes -1, 4 i 22- va permetre conèixer la seva contribució en la formació de les diferents morfologies nuclears anòmales (**Figura 1**), demostrant-se que els cromosomes amb



majors taxes d'erosió telomèrica es trobaven més implicats en NPBs, MNs i Bs que no pas el cromosoma amb una longitud telomèrica no crítica (**Treball I**). Aquests resultats demostren clarament que les morfologies nuclears anòmales presents a les HMECs són conseqüència de la disfunció telomèrica, a través de la formació de cromosomes inestables capaços d'entrar en cicles BFB.

Una major implicació dels cromosomes amb telòmers curts en morfologies nuclears anòmales estava d'acord amb resultats previs del nostre grup de recerca on els cromosomes amb telòmers críticament erosionats també es

trobaven implicats en anomalies cromosòmiques estructurals (Soler et al., 2005). Per tant, tot plegat indica que els NPBs són conseqüència dels cromosomes dicèntrics resultants de la fusió de cromosomes amb telòmers disfuncionals, quan són tibats cap a

pols oposats del fus. El trencament d'aquests ponts per un únic punt originarà Bs transitoris, mentre que si es trenquen per més punts, els fragments originats seran inclosos en MNs. Per molt que els cromosomes 1 i 22 presentaven nivells similars de disfunció telomèrica (**Treball I**), la freqüència amb que els seus centròmers decoraven les morfologies nuclears anòmales era clarament desigual. La utilització de sondes de pintat cromosòmic va permetre determinar-ne el motiu (**Figura 1**). Aquest fet, a priori contradictori, s'explica per la diferent arquitectura que presenten els cromosomes 1 i 22 humans. El braç 1q presenta una longitud de 127 Mbp, mentre que, la longitud de 22p és tan sols de 15 Mbp. Donat que a PDs inicials en les HMECs estudiades la disfunció telomèrica afecta principalment a aquests extrems, no és d'estranyar que ambdós extrems cromosòmics es fusionin entre sí formant un dicèntric (1q;22p). En aquests cromosomes dicèntrics, tan sols una desena part de la cromatina intercentromèrica correspon al cromosoma 22. Aleshores si aquest cromosoma reorganitzat forma un pont anafàsic, aquest estarà representat bàsicament pel cromosoma 1. Per tant, una major contribució del cromosoma 1 a les morfologies nuclears anòmales s'explica per l'arquitectura que presenten els braços cromosòmics amb telòmers disfuncionals.

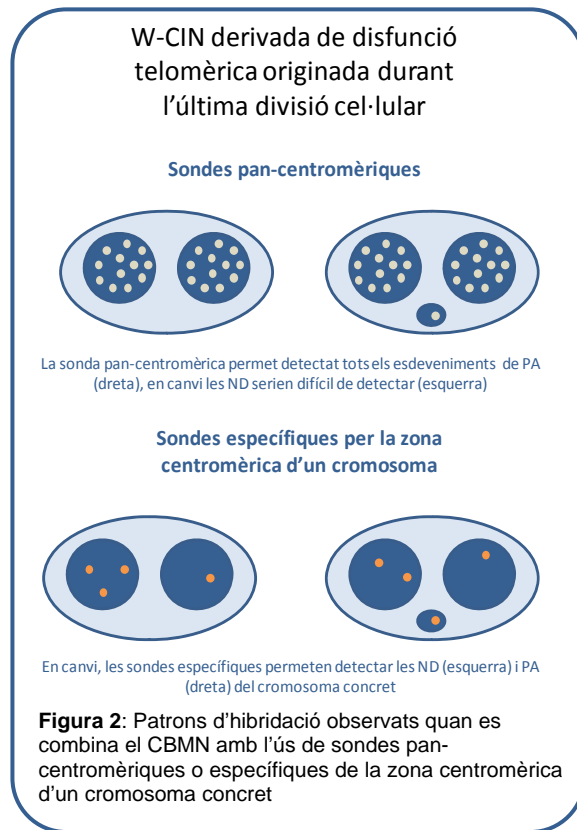
3.1.2 La integritat del pont cromatínic i la generació d'aneuploidies: inestabilitat cromosòmica de tipus numèrica (W-CIN)

S'ha suggerit que la disfunció telomèrica podria estar relacionada amb la generació d'aneuploidies en línies de càncer colorectal al demostrar-se que els cromosomes implicats en la formació de ponts anafàsics també segreguen incorrectament (Stewenius et al., 2005). En canvi, l'estudi de cèl·lules epitelials no tumorals no havia permès establir fins al moment de realitzar els nostres estudis una connexió entre els guanys i/o pèrdues cromosòmiques amb el fet que els cromosomes presentin telòmers críticament curts (Deng et al., 2007).

La valoració de W-CIN a les HMECs va fer-se mitjançant diferents tècniques. L'aplicació de sondes pancentromèriques a les BN-HMECs, va permetre avaluar la presència de cromosomes sencers en els MNs generats al llarg del cultiu (**Figura 2**). Encara que els MNs no augmentaven de forma significativa amb els PD, sí que hi havia un increment quan es consideraven únicament aquells MNs amb senyal centromèrica. Aquests resultats d'alguna manera relacionaven la creixent disfunció telomèrica que pateixen les

HMECs al llarg del cultiu amb la inducció de pèrdues anafàsiques. Tot i això, l'ús de sondes pancentromèriques no permet establir de manera fefaent que les pèrdues anafàsiques siguin degudes a problemes de segregació dels cromosomes amb telòmers

disfuncionals. Ni tampoc permet avaluar la contribució de l'escurçament telomèric en els possibles errors de segregació de cromosomes entre nuclis germans durant la mitosi (no-disjunció). Per tal de superar aquestes limitacions, es va combinar el *CBMN* amb sondes centromèriques específiques per a determinats cromosomes. D'aquesta manera, es podia avaluar d'una forma senzilla la presència de cromosomes amb segregacions errònies mitjançant l'anàlisi de la distribució dels senyals centromèrics en els nuclis germans de la cèl·lula binucleada (**Figura 2**). Així es podien distingir els processos de no-disjunció (distribució de senyals 3:1 entre els dos nuclis germans), dels de



pèrdua anafàsica (MNs amb senyal centromèric específic acompanyats per la manca de senyal en un dels nuclis principals).

Per tal de determinar si la disfunció telomèrica contribueix a la formació de cèl·lules aneuploides, es varen escollir sondes centromèriques específiques per dos cromosomes (1 i 22) amb perfil telomèric crític i un cromosoma (4) amb telòmers funcionals (*vegeu perfils telomèrics dels PD 29 i 36, Treball II, Figura 3*). L'anàlisi de les BN-HMECs mostrà que els cromosomes amb telòmers erosionats segreguen erròniament amb major freqüència que els cromosomes amb un perfil telomèric normal. A més, es va observar en les BN-HMECs que la pèrdua anafàsica era menys freqüent que la no-disjunció. Aquests resultats impliquen que els cromosomes dicèntrics íntegres "migren" cap a una de les cèl·lules filles originant una veritable no-disjunció.

Si això és així, en una població de HMECs no tractades amb citocalasina B, com a resultat de processos de no-disjunció s'hauran d'originar clons de cèl·lules monosòmiques i trisòmiques en les mateixes proporcions. Per contra, l'estudi de les HMECs no tractades amb citocalasina B (MoN-HMECs) amb les mateixes sondes de DNA demostrà una major prevalença de monosomies envers trisomies. Aquestes diferències podrien ser degudes a que en les cèl·lules BN mitjançant citocalasina B els nuclis de les cèl·lules germanes resten molt propers, incrementant la probabilitat que un cromosoma endarrerit respecte els altres durant l'anafase quedi englobat en un dels nuclis principals enlloc de formar un micronucli (Cimini et al., 1999). Malgrat això, s'ha de considerar la naturalesa inestable dels cromosomes dicèntrics. La no-disjunció d'un cromosoma dicèntric comporta, en una de les cèl·lules filles, la pèrdua completa (monosomia) d'un cromosoma. En canvi, l'altra cèl·lula guanyarà un cromosoma en forma de reorganització de naturalesa inestable i no un cromosoma normal. En les successives divisions, la cèl·lula que ha perdut el cromosoma dicèntric generarà un clon de cèl·lules monosòmiques. Per contra, la cèl·lula inicialment trisòmica, formarà amb molt poca probabilitat una progènie que exhibeixi aquest cromosoma aberrant, ja que aquest pot tornar a formar un pont en la següent anafase i reorganitzar-se de nou. D'acord amb aquests resultats s'ha establert una relació entre la presència de longituds telomèriques curtes, l'aparició de ponts anafàsics i de pèrdues cromosòmiques en biòpsies de colitis ulcerosa (O'Sullivan et al., 2002), essent les biòpsies amb menor longitud telomèrica les que presenten un major grau de monosomies.

En resum, la disfunció telomèrica dispara una seqüència d'esdeveniments que culminen amb la desestabilització del cariotip, no només per mitjà de la generació d'inestabilitat cromosòmica de tipus estructural, sinó que també constitueix una font d'inestabilitat cromosòmica numèrica: la segregació errònia dels cromosomes dicèntrics genera guanys i/o pèrdues de cromosomes sencers.

3.1.3 El paper dels microtúbuls en la segregació de ponts anafàsics i la generació de W-CIN

Els nostres resultats indiquen que els ponts anafàsics resultants de fusions de cromosomes amb disfunció telomèrica, a més de trencar-se durant l'anafase i donar lloc a anomalies de tipus estructural, també poden restar íntegres i segregar erròniament

entre els nuclis de les cèl·lules filles generant W-CIN en les successives divisions. Però, què fa que un cromosoma dicèntric segregui erròniament enlloc de trencar-se durant l'anafase? Podria succeir que els microtúbuls cinetocòrics (*k-fibers*), responsables de tibar les cromàtides cap als pols del fus perdessin la seva connexió a nivell de cinetocor al generar-se forces tensoras en direccions contràries quan es tracta de tibar una cromàtide dicèntrica.

Les cromàtides germanes són tibades cap als pols oposats del fus quan la unió entre elles desapareix a l'inici de l'anafase, al degradar-se les cohesines. La migració de les cromàtides es produeix gràcies a l'escurçament dels microtúbuls cinetocòrics (*k-fibers*), tant a nivell de cinetocor –pol positiu- com a nivell de centrosoma –pol negatiu. Però que succeeix durant l'anafase quan els dos cinetocors d'una cromàtide dicèntrica són tibats simultàniament cap a pols oposats? És evident que aquesta situació genera un conjunt de forces oposades. Per una banda hi ha els microtúbuls que tiben els cinetocors i per l'altra la cromatina que intervé en el pont cromatínic oposa resistència. Recolza aquest fet l'observació en estudis de microscòpia a temps real de cèl·lules provinents de línies de càncer colorectal que, quan els ponts es trenquen, els Bs generats es contrauen ràpidament cap al pol, quedant integrats amb la resta de cromosomes (Shimizu et al., 2005). D'acord amb aquesta idea, l'aparició d'aneuploïdies degudes a la segregació errònia de cromosomes dicèntrics podria ser deguda al trencament de les *k-fibers* que intervenen en la seva segregació (Stewenius et al., 2005). Malgrat això, un estudi indicà que el trencament dels microtúbuls no succeeix durant la resolució dels ponts anafàsics (Deng et al., 2007).

Per tal d'analitzar a fons si la presència d'anomalies en l'ancoratge de les *k-fibers* als cinetocors podria propiciar la pèrdua de vincle entre els microtúbuls i la cromatina interferint amb la seva segregació, van analitzar-se les unions MT-KT durant la segregació de ponts anafàsics mitjançant microscòpia confocal amb tecnologia *swept field* (Treball III). Els resultats obtinguts van ser del tot inesperats. Les anàlisis de les imatges indicaren que els microtúbuls gairebé mai perden la seva connexió amb els cinetocors dels cromosomes que estan formant un pont cromatínic (Treball III). A més, aquest efecte es produïa tant en les HMECs, on els ponts cromatínics son resultat de disfunció telomèrica, com en cèl·lules Ptk1, on els ponts s'havien induït pel tractament amb l'agent radiomimètic bleomicina. Tot plegat fa pensar que la resistència oposada per

la cromatina dels cromosomes inestables en la seva migració cap als pols no causa la disrupció de la unió MT-KT. I per tant, la W-CIN observada en les BN-HMECs i l'aneuploïdia exhibida per les MoN-HMECs (**Treball II**) no pot ser explicada per un trencament no programat de la unió MT-KT.

Llavors, si la cromatina no es trenca i els MT no perden la seva connexió amb els cinetocors de les cromàtides dicèntriques, com pot produir-se l'aneuploïdia? Sorprenentment, els nostres estudis van permetre determinar que la resistència que oposa la cromatina que intervé en el pont anafàsic interfereix amb la seva migració. L'anàlisi 3D de la distància entre els cinetocors dels ponts anafàsics i els pols va permetre determinar que, en la majoria dels casos, aquests es trobaven en una posició més equatorial que els cinetocors dels cromosomes normals, els quals es trobaven comparativament més propers als pols (**Treball III**). Aquest fet, especialment accentuat en alguns casos on el pont quedava físicament separat de la massa de cromatina, podria ser responsable de la segregació anòmala dels ponts anafàsics.

Aquest retard en la migració implica, en absència de canvis en el grau de condensació de la cromatina, que durant l'anafase ha d'existir una menor despolimerització de les *k-fibers* que tiben del pont o bé una polimerització neta de les *k-fibers* als cinetocors. Està establert que per produir-se la migració de les cromàtides germanes durant l'anafase les *k-fibers* despolimeritzen pels seus dos extrems (Brust-Mascher and Scholey, 2002; Maddox et al., 2002; Sharp et al., 2000). Malgrat això, podria ser que la tensió exercida pel pont anafàsic fos detectada per proteïnes que promoguessin la polimerització local dels MT a nivell de cinetocor, tal i com succeeix durant la migració dels cromosomes a la placa metafàsica durant la prometafase (Maddox et al., 2003). En les HMECs, l'anàlisi de la presència de la proteïna EB1, que es localitza a l'extrem dels microtúbuls quan polimeritzen, va permetre determinar que les *k-fibers* unides als cinetocors que no formen part d'un pont poden polimeritzar durant l'anafase. Aquests resultats estarien d'acord amb altres estudis que havien mostrat mitjançant seguiments a temps real amb vídeo-microscòpia que els microtúbuls cinetocòrics eren capaços de polimeritzar durant l'anafase (Cimini et al., 2004). I amb estudis posteriors que semblen indicar que a l'extrem positiu existeix una fluctuació entre estats de polimerització i despolimerització (Tirnauer et al., 2002; Zhang et al., 2007). Pel que fa als cinetocors de les cromàtides dicèntriques que formaven els ponts, es va observar que aquests presentaven una major

freqüència de marcatge d'EB1 que els cinetocors de les cromàtides naturals. Aquesta observació indica que durant l'anafase la tensió generada pels ponts podia conduir a una polimerització transitòria incrementada de les *k-fibers* causant un retard en la segregació dels ponts anafàsics cap als pols.

Aleshores, poden d'alguna manera aquests resultats explicar com els ponts cromatínics poden resoldre's generant aneuploidies? La formació de l'embolcall nuclear al voltant de cada nucli germà coincideix amb el final de la mitosi, concretament a telofase (Anderson and Hetzer, 2007). Un estudi utilitzant cèl·lules fixades va suggerir que un cromosoma retardat pot ser incorporat al nucli principal o ser finalment incorporat en un micronucli generant una pèrdua anafàsica (Ford et al., 1988). Aquest fet va ser confirmat posteriorment mitjançant el seguiment de cèl·lules vives a temps real (Cimini et al., 2002). La distància física que separa el cromosoma retardat del nucli principal és el que determina que aquest sigui encapsulat en un micronucli (Webster et al., 2009). Així doncs, es podria argumentar que els ponts anafàsics que resten especialment relegats a una zona més equatorial i romanen íntegres fins a telofase podrien formar un embolcall independent al del nucli principal tot generant un micronucli i la consegüent aneuploidia. En aquest sentit, la valoració de marcatge centromèric (CREST) sobre MNs en les HMECs (**Annex de resultats 2**) va mostrar que un 50% dels MNs presentaven 2 cinetocors, mentre que un 25% dels casos presentaven més de dos senyals. De forma similar, l'anàlisi de senyals centromèriques específiques per als cromosomes 1, 22 i 4 en MNs confirmà que els cromosomes amb telòmers erosionats -1 i 22- sovint es trobaven inclosos alhora dins dels MNs (**Treball II, Taula3**).

L'anàlisi de les BN-HMECs també va indicar que les cromàtides dicèntriques poden romandre íntegres i ser finalment incorporades en un dels nuclis germans generant una no-disjunció (**Treball II**). Dels resultats obtinguts en el **Treball III** es podria hipotetitzar que els cromosomes dicèntrics relegats a la zona equatorial del fus podrien ser escombrats cap a una de les cèl·lules filles quan es produeix l'estrangulament de l'anell contràctil durant la citocinesi (**Figura 3**), tal i com s'ha vist en cèl·lules Ptk1 (Daniela Cimini, comunicació personal).

Tot plegat indica que la tensió oposada per la cromatina que intervé en el pont no és capaç de trencar les unions MT-KTs, però sí que pot interferir amb la seva segregació

(**Treball III**). Els ponts relegats a la zona equatorial durant la seva migració poden donar lloc a aneuploidies en forma de micronuclis o de no-disjuncions.

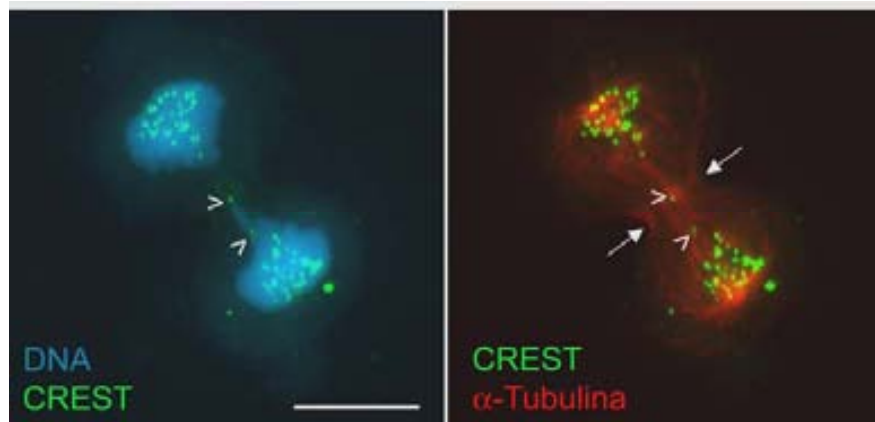


Figura 3. No-disjunció en HMECs. L'anàlisi dels ponts cromatínics durant la telofase va permetre observar, en determinades ocasions, que aquests es trobaven desplaçats cap a una de les cèl·lules filles, fet que incrementa les probabilitats de no-disjunció. En la imatge s'observa que un dels extrems del pont cromatínic (puntes de fletxa) es troba totalment desplaçat, localitzant-se just en la zona d'avenç de l'anell contràctil (imatge dreta, fletxes). (La barra blanca correspon a 10 μ m)

3.1.4 *No hay dos sin tres*, els ponts anafàsics també poden bloquejar la citocinesi

A més de la presència de cèl·lules amb un contingut aneuploide de cromosomes, durant el cultiu de les HMECs s'observà l'aparició d'una població tetraploide de cèl·lules, fet prèviament descrit per Romanov i col·laboradors (Romanov et al., 2001). Per aprofundir si l'aparició de cèl·lules poliploides té relació amb l'escurçament telomèric que pateixen les HMECs va realitzar-se un anàlisi exhaustiu del contingut de DNA de les HMECs al llarg del cultiu per citometria de flux combinant la tinció amb iodur de propidi –per detectar la quantitat de DNA- amb la immunodetecció de ciclina D1 –específica de cèl·lules a G1 (**Treball IV, Figura 1A**). Els resultats no només confirmaren l'existència d'aquesta població tetraploide, sinó que també mostraren que la fracció de HMECs poliploides augmenta a mesura que les cèl·lules proliferen en cultiu. És més, es va determinar que la freqüència de tetraploidies correlaciona amb la taxa d'erosió telomèrica (**Treball III, Figura 1E**) i amb la presència de cromosomes inestables (**Annex**

de resultats 4). Per tant, tot sembla indicar que la disfunció telomèrica també està al darrere d'un altre tipus de manifestació de CIN: la tetraploidització de les cèl·lules.

Tal i com s'ha apuntat anteriorment (*vegeu apartat 1.2.1 de la Introducció*), les cèl·lules després de replicar el DNA poden escapar del cicle abans de l'anafase per *mitotic slippage* o mitjançant mecanismes d'endoreduplicació originant cèl·lules tetraploides mononucleades. S'ha descrit que l'erosió telomèrica podria contribuir a la tetraploidització cel·lular mitjançant mecanismes diversos. Per una banda, la poliploïdia pot aparèixer quan s'indueix la linearització persistent de tots els extrems cromosòmics. Els telòmers lineals són reconeguts com a DSBs al DNA activant-se el punt de control de G2 i impedit-se l'entrada en mitosi. En última instància les cèl·lules entren a G1 amb un complement cromosòmic doblat –procés conegut com a endoreduplicació. Aquesta consecució d'esdeveniments s'ha demostrat recentment en un estudi realitzat per l'equip de la Dra. de Lange en MEFs deficientes per p53 i doble mutants per les proteïnes telomèriques POT1 i 2 (Davoli et al., 2010). Alternativament les cèl·lules tetraploides originades per comportaments anòmals després de l'anafase exhibeixen dos nuclis dins del mateix citoplasma. Errors en la citocinesi deguts a la presència d'una massa de cromatina sota el solc de divisió han estat relacionats amb fenòmens de tetraploidització (Mullins and Biesele, 1977). En les HMECs l'acumulació gradual de cèl·lules poliploides amb una morfologia binucleada suggereix que els ponts anafàsics originats per erosió telomèrica interfereixen amb la consecució de la citocinesi.

La citocinesi comença just després que s'iniciï l'anafase, visualitzant-se com una petita invaginació de la membrana plasmàtica a conseqüència de l'activació de l'anell contràctil d'actina i miosina. L'estrangulació del citoplasma prossegueix continuadament fins que les cèl·lules germanes resten connectades per un coll estret anomenat *midbody*. Aquesta zona està formada bàsicament per un romanent de microtúbuls solapats, els quals ara es troben desconnectats dels pols. Aquest estretament progressiu constitueix el pas previ a la separació de les cèl·lules filles (Glotzer, 2001). L'últim pas de la citocinesi, l'abscisió, succeeix quan les cèl·lules filles se separen totalment uns 60 minuts després de que el citoplasma esdevingui totalment estrangulat (Steigemann et al., 2009). Aquest últim procés, necessari per a la generació de dues cèl·lules filles, depèn tant de factors que es troben al *midbody* com de la migració a aquesta zona d'un dels centríols del centrosoma (Glotzer, 2001; Piel et al., 2001).

L'estudi *in vivo* de divisions cel·lulars en les HMECs a temps real (**Treball IV**) mostrà una onada de binucleació que se situa més tard en el temps al que s'esperava que es produís l'abscisió. Aquests resultats suggereixen que malgrat l'intent cel·lular per evitar la poliploidització, la persistència de la cromatina en el solc de divisió conduiria en última instància a un avortament de la citocinesi. A més, en comparar la freqüència de ponts anafàsics en cèl·lules fixades a telofase i a G1 just abans de l'abscisió (**Treball IV**) s'observà un enriquiment d'aquestes estructures en aquestes últimes. Aquesta acumulació de cèl·lules a G1 recent dividides exhibint ponts cromatínics juntament amb l'emergència espontània de cèl·lules binucleades, quan teòricament ja haurien d'haver completat l'abscisió, suggereix que els ponts anafàsics constitueixen una barrera física que impedeix l'acabament de la citocinesi.

En llevat existeix un punt de control capaç d'impedir el procés d'abscisió quan defectes en el *midbody* s'acompanyen d'una segregació cromosòmica errònia (Norden et al., 2006). Aquest punt de control es troba mediat per la proteïna Ipl1 (homòloga de la proteïna cinasa Aurora B de mamífers) que és capaç d'activar-se en presència de cromatina en el pla de divisió, concretament detecta cromatina acetilada (Mendoza et al., 2009). Quan apareixen errors en aquest punt de control, l'abscisió succeeix normalment originant trencaments de doble cadena en el DNA. Un mecanisme similar s'ha observat en cèl·lules HeLa, on l'Aurora B també presenta un paper rellevant en la regulació del temps d'abscisió depenent de la presència de cromatina en el solc de divisió cel·lular (Steigemann et al., 2009). Concretament s'ha observat que la presència de DNA en el punt d'abscisió de la citocinesi manté Aurora B activa. Això permet als substrats d'Aurora B, com ara Mkp1, ser fosforilats. Quan Mkp1 es troba activada, s'estabilitza un canal intercel·lular entre les dues cèl·lules germanes impedit-se l'abscisió. La resolució espontània dels ponts de cromatina, degut al seu trencament, inactiva Aurora B. Això permet la finalització de la citocinesi gràcies a que es desestabilitza el canal intercel·lular. Tot plegat ha conduït a suggerir en cèl·lules humanes que l'Aurora B funcionaria com un sensor de cromatina a nivell del solc de divisió, gràcies a la capacitat que té aquesta proteïna llançadora de travessar l'embolcall nuclear (Steigemann et al., 2009).

Aleshores els ponts anafàsics que romanen íntegres fins a etapes post-telofàsiques constitueixen una interferència física capaç de retardar el procés d'abscisió i en última

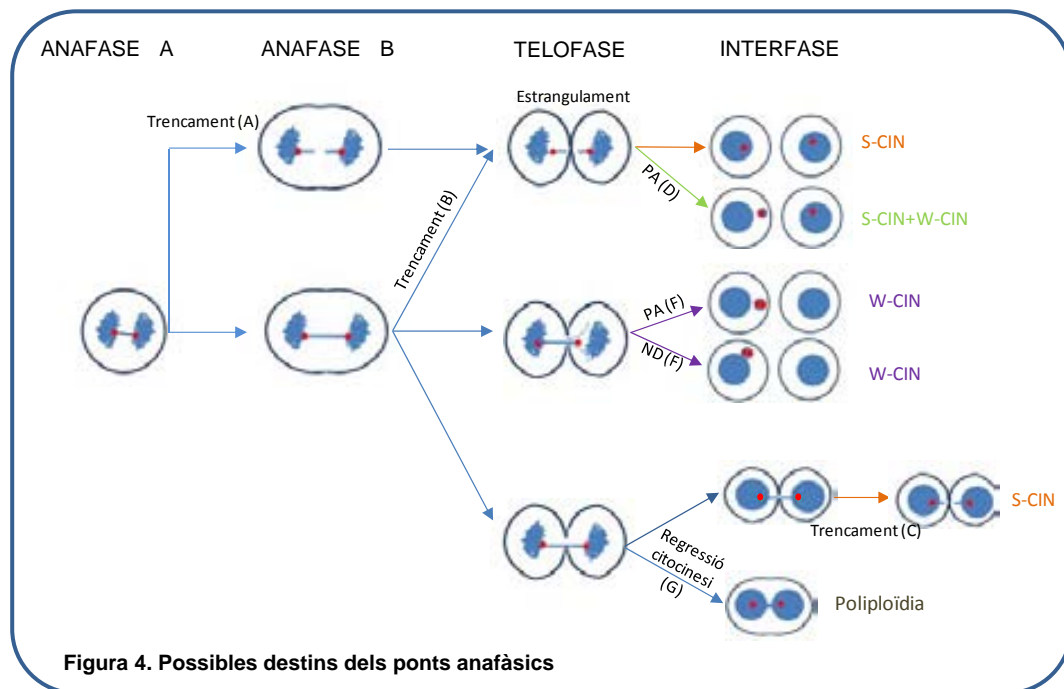
instància causar la regressió del solc de la citocinesi. Malgrat això, encara no s'ha determinat si la presència de membrana envoltant el pont cromatínic és un factor clau que pugui determinar el destí de les cèl·lules que s'han de dividir: 1) formació de dues cèl·lules filles quan es produeix la fragmentació del pont; 2) mantenir-se connectades per un canal citoplasmàtic quan el pont no s'ha resolt; o 3) formar-se una cèl·lula poliploide binucleada quan es produeix la regressió de l'anell contràctil. Un altre esdeveniment clau per a que es dugui a terme l'abscisió és la migració d'un dels centríols des d'un dels pols del fus (centrosoma) fins a la zona d'abscisió (Piel et al., 2001). En aquest sentit la presència de cromatina també pot interferir físicament amb la migració del centríol a la zona mitja (Huang et al., 2008) i interferint així la citocinesi.

3.1.5 Inestabilitat cromosòmica deguda a disfunció telomèrica: la renovació dels cicles BFB

Des de la descripció dels cicles BFB per Bàrbara McClintock l'any 1942, s'ha discutit molt sobre el destí dels ponts anafàsics (Gisselsson, 2001; Shimizu et al., 2005). El que suggereixen els nostres resultats és que els ponts cromatínics que emergeixen durant l'anafase poden presentar diversos destins segons la distància intercentromèrica dels cromosomes dicèntrics formats (**Figura 4**):

- El seu trencament pot succeir durant l'anafase (**Figura 4A**), amb l'escurçament dels microtúbuls cinetocòrics o posteriorment (**Figura 4B i C**), abans que tingui lloc l'abscisió (**Treball I i III**). En qualsevol cas, el trencament del pont anafàsic es dona amb més probabilitats en el braç cromosòmic que aporta més DNA en la distància intercentromèrica (**Treball I**). Aquest fet comporta que una de les dues cèl·lules filles contingui una deleció d'un fragment cromosòmic, mentre que l'altra en guanyi una porció.
- Un altre escenari pot succeir quan una porció del cromosoma trencat es manté físicament separada del nucli principal durant la reformació de l'embolcall nuclear i, aleshores aquest és finalment encapsulat en un MN originant una pèrdua anafàsica (PA) (**Figura 4D**).
- Si el pont anafàsic roman íntegre, amb l'avenç de l'anell contràctil tot el dicèntric pot ser finalment escombrat a una de les dues cèl·lules filles originant una no-disjunció (ND) o una pèrdua anafàsica (**Figura 4E i F**), depenent si durant la reformació de l'embolcall nuclear la cromàtide dicèntrica és incorporada o no, dins el nucli principal (**Treball II i III**).
- Finalment, quan el pont nucleoplasmàtic roman íntegre i queda sota l'anell contràctil, pot

interferir amb l'abscisió fins al punt que es produeixi una regressió de la citocinesi originant una cèl·lula tetraploide binucleada (**Figura 4G**).



Tot plegat indica que la resolució dels ponts anafàsics pot donar lloc a inestabilitat cromosòmica de tipus estructural i numèrica, a més de l'aparició de cèl·lules tetraploides amb un nombre de centròmers duplicat.

3.2 Disfunció telomèrica, inestabilitat cromosòmica i càncer

La inestabilitat cromosòmica constitueix un fet clau capaç d'afavorir la tumorigènesi en humans. D'entre els mecanismes capaços de conduir a l'aparició d'inestabilitat cromosòmica en les cèl·lules epitelials proliferants cal destacar la disfunció telomèrica en combinació amb defectes en punts de control del cicle cel·lular. En humans, sota condicions fisiològiques, existeix una disminució telomèrica progressiva en cèl·lules proliferants que depèn de l'edat i que condueix a l'acumulació gradual de telòmers críticament curts i disfuncionals. D'acord amb això, la valoració de la longitud telomèrica

en diversos teixits humans ha mostrat un significat escurçament telomèric en lesions neoplàsiques pre-invasives, i també en foci d'epiteli normal (Chin et al., 2004; Meeker and Argani, 2004). La inestabilitat cromosòmica també pot aparèixer a conseqüència d'una població cel·lular tetraploide (4N) amb centrosomes supernumeraris. I no només això, sinó que s'ha proposat que aquesta població tetraploide podria promoure activament l'aparició del tumor. En relació amb aquest fet, la majoria de tumors sòlids a banda de mostrar anomalies estructurals i numèriques (Pandis et al., 1993) també exhibeixen continguts de DNA poliploides (Storchova and Kuffer, 2008) i alteracions en l'estructura i/o el nombre de centrosomes per cèl·lula (Pihan et al., 2003; Salisbury et al., 2004; Sato et al., 1999). La presència de centrosomes extra causaria una pèrdua gradual de cromosomes a les cèl·lules tetraploides. Fet que explica que els tumors presentin duplicacions inexactes del complement cromosòmic (Storchova and Kuffer, 2008). D'acord amb els resultats obtinguts en els **Treballs I i II** l'escurçament telomèric és capaç de generar tant defectes cromosòmics de tipus estructural com de tipus numèric susceptibles a contribuir al desenvolupament de les neoplàsies epitelials. I no només això, amb el **Treball IV** s'ha delineat una possible connexió entre la disfunció telomèrica i la poliploidització cel·lular. Per tant, tot plegat suggereix que la disfunció telomèrica podria promoure la carcinogènesi, no només per mitjà de la generació de S-CIN i/o W-CIN, sinó que també ho faria a través de l'aparició d'una població poliploide altament inestable (*vegeu següent apartat*).

3.2.1 De quin mal hem de morir: les conseqüències de la tetraploidització

Fa alguns anys es va proposar l'existència d'un punt de control "tetraploide" a G1 que impedia proliferar a les cèl·lules 4N (Andreassen et al., 2001; Margolis et al., 2003). En aquests estudis l'existència del punt de control a G1 s'havia determinat en cèl·lules en les que s'havia bloquejat la citocinesi artificialment mitjançant la utilització de tractaments amb drogues que actuen a nivell de citoesquelet (com la citocalasina B). Aquest punt de control podia superar-se amb la inactivació de la via de p53-p21 permetent a les cèl·lules tetraploides seguir proliferant en cultiu. Malgrat això, estudis posteriors han determinat que aquests tipus de drogues constitueixen un estrès per a les cèl·lules i que el seu ús causa una entrada prematura en senescència (Wong and Stearns, 2005). Així doncs, el punt de control "tetraploide" resultà ser un artefacte de la tècnica emprada per obtenir cèl·lules tetraploides (Uetake and Sluder, 2004; Wong and Stearns, 2005). Aquests

resultats estarien d'acord amb el fet que la condició de ser tetraploide *per se* no genera cap tipus de senyal d'apoptosi (Decordier et al., 2007). Així mateix, els nostres estudis en les HMECs han demostrat la generació d'una població 4N de cèl·lules amb capacitat proliferativa al llarg del cultiu (**Treball IV**).

L'aparició de cèl·lules tetraploides va lligada a la presència de centrosomes supernumeraris, capaços de generar W-CIN en les cèl·lules filles proliferants. Altres mecanismes diferents a la tetraploidització han estat descrits com a font d'amplificació centrosòmica (vegeu **Introducció**). Entre d'altres, s'ha establert que anomalies en proteïnes de la via p53-p21 i/o de la via p16^{INK4a}-pRb poden donar lloc a defectes en la duplicació del centrosoma/centríol. En el cas concret de les HMECs, un treball realitzat pel grup de la Dra. Tlsty suggerí que l'amplificació de centrosomes en aquestes cèl·lules estava directament causada per la manca d'expressió de p16^{INK4a} i no a processos de tetraploidització (McDermott et al., 2006). Després de quantificar el contingut de DNA en cèl·lules tenyides amb iodur de propidi, la majoria de cèl·lules mononucleades amb més de dos centrosomes exhibia un contingut de DNA diploide (McDermott et al., 2006). En aquest estudi s'excloïen de l'anàlisi les HMECs binucleades, les quals són una font coneguda d'amplificació de centrosomes (**Treball IV**). Per contra, al nostre estudi l'amplificació de centrosomes en cèl·lules diploides tan sols representa un 17% de les cèl·lules amb centrosomes extra (**Treball IV**). Tot i que l'amplificació de centrosomes en cèl·lules diploides seguida d'una tetraploidització podria emmascarar l'amplificació centrosòmica deguda a la inactivació de p16^{INK4a}, els nostres resultats suggereixen que el principal mecanisme per l'adquisició d'un nombre extra de centrosomes és la poliploidització deguda a la disfunció telomèrica, mentre que la contribució directa de p16^{INK4a} seria residual.

Sigui quin sigui l'origen de la presència de centrosomes addicionals, aquests poden afectar la supervivència de les cèl·lules. És raonable pensar que nivells baixos de CIN poden ser perpetuats a la progènie mentre que cèl·lules altament aneuploides serien susceptibles a patir processos d'apoptosi. El nivell de CIN de les cèl·lules amb centrosomes supernumeraris està determinat pel tipus de fus generat durant la mitosi. En aquest sentit la formació de fusos multipolars causa una repartició a l'atzar dels cromosomes en les cèl·lules filles, fet normalment incompatible amb la viabilitat cel·lular (Brinkley, 2001; Ganem et al., 2009). Estudis en cèl·lules tumorals han demostrat que

aquestes poden proliferar sense que es vegi afectada la seva viabilitat, gràcies a que són capaces d'agrupar els centrosomes supernumeraris a dos pols (Ganem et al., 2009). Per molt que el mecanisme pel qual les cèl·lules adquireixin la capacitat d'agrupar centrosomes en excés es desconeix, estudis recents apunten a que la tensió exercida pel fus mitòtic té un paper rellevant (Leber et al., 2010). Els resultats exposats al **Treball IV** mostren que les HMECs poliploides, tot i presentar centrosomes supernumeraris, poden proliferar al llarg del cultiu gràcies a la coalescència de centrosomes.

Tot plegat resulta en la formació de HMECs tetraploides que contenen una S-CIN i W-CIN intrínseca deguda a disfunció telomèrica, més la W-CIN resultant del reagrupament de centrosomes i l'aparició d'ancoratges anòmals de tipus merotèlics (Ganem et al., 2009; Silkworth et al., 2009). I no només això sinó que les HMECs tetraploides presenten uns nivells més elevats de S-CIN com de W-CIN que les cèl·lules diploides parentals (**Treball IV, Annex de resultats 5 i 6**).

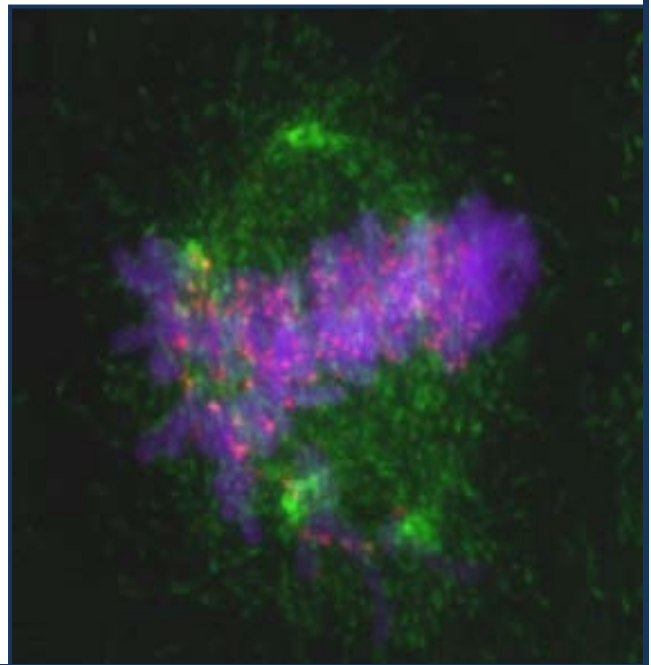
3.2.2 Tetraploïdies i desenvolupament tumoral

S'ha suggerit que la tetraploidització podria jugar un paper rellevant durant la carcinogènesi. Quan es tracta de cèl·lules amb inestabilitat cromosòmica, la condició de cèl·lula poliploide pot presentar avantatges per a la supervivència en comparació amb les diploides. Les conseqüències deletèries causades per la pèrdua de cromosomes sencers o fragments cromosòmics podria veure's tamponada en les cèl·lules 4N per la presència de dotacions cromosòmiques addicionals. Tenint més de dos jocs de cromosomes, les mutacions letals presents en un al·lel podrien ser emmascarades pels altres al·lells salvatges. Tot plegat, situa a les cèl·lules tetraploides en avantatge a l'hora de proliferar en presència de CIN i per tant aquestes cèl·lules podrien tenir una capacitat incrementada a poder iniciar un procés neoplàsic. Prova d'això és l'observació que cèl·lules epitelials mamàries tetraploides de ratolins $p53^{-/-}$ poden desencadenar l'aparició de tumors quan són trasplantades en ratolins immunodeficients, mentre que les cèl·lules diploides isogèniques no (Fujiwara et al., 2005). Arrel d'aquests resultats, estudis posteriors utilitzant models murins amb alteracions en diversos gens relacionats amb la mitosi (com la sobreexpressió de Mad2 o la sobreexpressió d'Aurora A) (*vegeu apartat 1.3.2 Introducció*) han posat de rellevància que el desenvolupament tumoral es produeix conjuntament amb una tetraploidització cel·lular. I no tan sols això, sinó que a nivell

cel·lular tant la inestabilitat cromosòmica numèrica com estructural hi són presents (Sotillo et al., 2007; Wang et al., 2006). Tot plegat indica que les cèl·lules tetraploides, per mitjà de la inestabilitat cromosòmica que presenten, afavoreixen el desenvolupament de les neoplàsies.

En humans, la seqüència de tetraploidització seguida d'una pèrdua cromosòmica succeeix durant el desenvolupament de tumors sòlids (Dutrillaux et al., 1991; Shackney et al., 1989). Tot plegat suggereix que les cèl·lules tetraploides serien més propenses a esdevenir malignes i promoure de forma activa del desenvolupament tumoral (Storchova and Kuffer, 2008). A banda de la tetraploidització, la disfunció telomèrica també pot ser un potent instigador del desenvolupament tumoral. Longituds telomèriques críticament erosionades s'observen en etapes primerenques durant la carcinogènesi epitelial (Engelhardt et al., 1997; Meeker et al., 2004; Ohashi et al., 1996). Així doncs, tant la disfunció telomèrica com l'aparició de cèl·lules poliploides són esdeveniments que succeeixen aviat en la carcinogènesi. Els estudis realitzats en aquesta tesi estableixen una connexió entre la disfunció telomèrica i la tetraploidització tot donant rellevància a l'existència d'un intermediari tetraploide altament inestable generat per disfunció telomèrica en els estadis inicials del procés tumoral. Els nostres resultats poden explicar de manera senzilla la coexistència de fenòmens de S-CIN, W-CIN, anomalies de ploïdia i de centrosomes sovint observats en lesions premalignes i malignes de la carcinogènesi humana.

Conclusions



4. Conclusions

1a

L'entrada de cromàtides o cromosomes dicèntrics –resultants de disfunció telomèrica– en cicles BFB, genera una inestabilitat cromosòmica massiva que es visualitza amb la presència de morfologies nuclears anòmales. Primerament es produeix la formació de ponts cromatínics durant l'anafase. Aleshores, la tensió exercida des dels pols del fus mitòtic provoca el trencament dels ponts originant protuberàncies nuclears i en menor mesura micronuclis. Tot plegat recolza a la disfunció telomèrica com a font generadora de les diferents morfologies nuclears anòmales i assenyala el recompte de protuberàncies nuclears com a bon marcador d'inestabilitat cromosòmica en un ambient de disfunció telomèrica

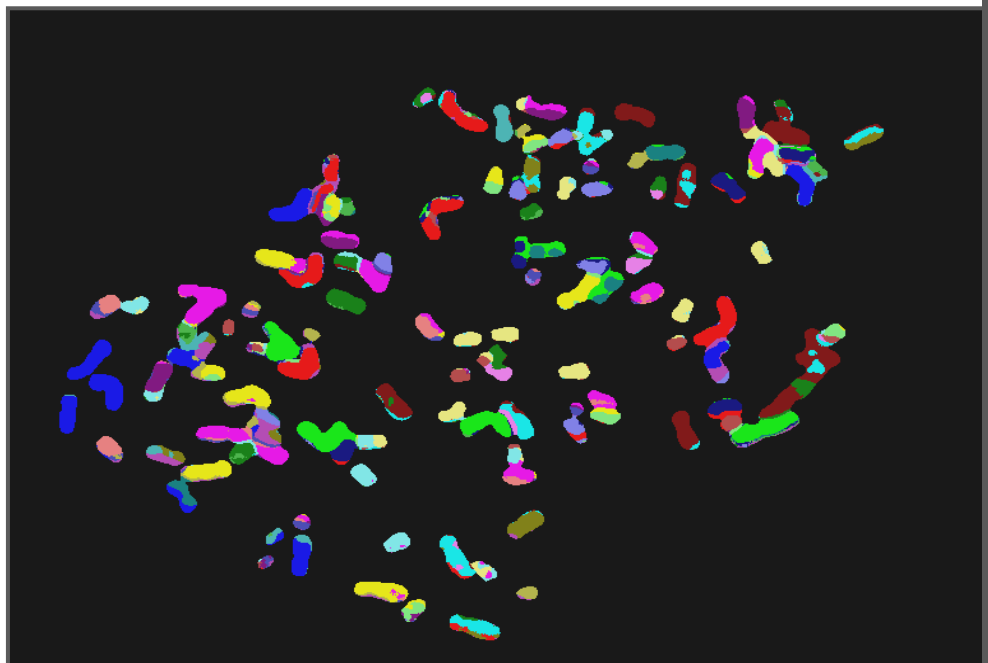
2a

Els ponts anafàsics freqüentment es trenquen durant l'anafase, malgrat això poden tenir destins alternatius. La tensió de la cromatina que intervé en el pont pot retardar la seva migració als pols. Aleshores, aquestes cromàtides dicèntriques, que romanen íntegres a l'equador de la cèl·lula, poden ser segregades de forma errònia cap al nucli d'una de les cèl·lules filles originant una no-disjunció, ser incorporades en un micronucli generant una pèrdua anafàsica, o be romandre sota el solc de divisió retardant el procés d'abscisió i finalment avortar la citocinesi tot generant una cèl·lula poliploide.

3a

La disfunció telomèrica progressiva no només resulta en l'acumulació de cèl·lules diploides inestables on coexisteixen la S-CIN amb la W-CIN, sinó que genera cèl·lules poliploides on la S-CIN i la W-CIN es veu intensificada per l'aparició de centrosomes supernumeraris. Tot plegat demostra que la disfunció telomèrica és un factor instigador de l'aparició d'un intermediari tetraploide amb elevada CIN, el qual es trobaria en la base de la carcinogènesi humana.

Bibliografia



5. Bibliografia

A

Acilan, C., D.M. Potter, and W.S. Saunders. 2007. DNA repair pathways involved in anaphase bridge formation. *Genes Chromosomes Cancer*. 46:522-31.

Ailles, L.E., and I.L. Weissman. 2007. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol*. 18:460-6.

Allsopp, R.C., H. Vaziri, C. Patterson, S. Goldstein, E.V. Younglai, A.B. Futcher, C.W. Greider, and C.B. Harley. 1992. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:10114-8.

Ambros, I.M., S. Rumpler, A. Luegmayr, C.M. Hattinger, S. Strehl, H. Kovar, H. Gadner, and P.F. Ambros. 1997. Neuroblastoma cells can actively eliminate supernumerary MYCN gene copies by micronucleus formation--sign of tumour cell revertance? *Eur J Cancer*. 33:2043-9.

Anderson, D.J., and M.W. Hetzer. 2007. Nuclear envelope formation by chromatin-mediated reorganization of the endoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol*. 9:1160-6.

Andreassen, P.R., O.D. Lohez, F.B. Lacroix, and R.L. Margolis. 2001. Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. *Mol Biol Cell*. 12:1315-28.

Antonarakis, S.E., R. Lyle, E.T. Dermitzakis, A. Reymond, and S. Deutsch. 2004. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet*. 5:725-38.

Armanios, M. 2009. Syndromes of telomere shortening. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 10:45-61.

Artandi, S.E., S. Chang, S.L. Lee, S. Alson, G.J. Gottlieb, L. Chin, and R.A. DePinho. 2000. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *NATURE*. 406:641-5.

B

Babu, J.R., K.B. Jeganathan, D.J. Baker, X. Wu, N. Kang-Decker, and J.M. van Deursen. 2003. Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation. *J Cell Biol*. 160:341-53.

Baker, D.J., K.B. Jeganathan, J.D. Cameron, M. Thompson, S. Juneja, A. Kopecka, R. Kumar, R.B. Jenkins, P.C. de Groen, P. Roche, and J.M. van Deursen. 2004. BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat Genet*. 36:744-9.

Balczon, R., L. Bao, W.E. Zimmer, K. Brown, R.P. Zinkowski, and B.R. Brinkley. 1995. Dissociation of centrosome replication events from cycles of DNA synthesis and mitotic division in hydroxyurea-arrested Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol*. 130:105-15.

Barcellos-Hoff, M.H., and S.A. Ravani. 2000. Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells. *Cancer Res*. 60:1254-60.

Barrett, M.T., D. Pritchard, C. Palanca-Wessels, J. Anderson, B.J. Reid, and P.S. Rabinovitch. 2003. Molecular phenotype of spontaneously arising 4N (G2-tetraploid) intermediates of neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Cancer Res.* 63:4211-7.

Basto, R., K. Brunk, T. Vinadogrova, N. Peel, A. Franz, A. Khodjakov, and J.W. Raff. 2008. Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies. *Cell.* 133:1032-42.

Baudot, A., F.X. Real, J.M. Izarzugaza, and A. Valencia. 2009. From cancer genomes to cancer models: bridging the gaps. *EMBO Rep.* 10:359-66.

Benetos, A., J.P. Gardner, M. Zureik, C. Labat, L. Xiaobin, C. Adamopoulos, M. Temmar, K.E. Bean, F. Thomas, and A. Aviv. 2004. Short telomeres are associated with increased carotid atherosclerosis in hypertensive subjects. *Hypertension.* 43:182-5.

Blackburn, E.H., and J.G. Gall. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J Mol Biol.* 120:33-53.

Blasco, M.A., H.W. Lee, M.P. Hande, E. Samper, P.M. Lansdorp, R.A. DePinho, and C.W. Greider. 1997. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell.* 91:25-34.

Bodnar, A.G., M. Ouellette, M. Frolkis, S.E. Holt, C.P. Chiu, G.B. Morin, C.B. Harley, J.W. Shay, S. Lichtsteiner, and W.E. Wright. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* 279:349-52.

Bonnet, D., and J.E. Dick. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 3:730-7.

Boveri, T. 1914. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren

Brathen, M., H. Banrud, K. Berg, and J. Moan. 2000. Induction of multinucleated cells caused by UVA exposure in different stages of the cell cycle. *Photochem Photobiol.* 71:620-6.

Brenner, A.J., M.R. Stampfer, and C.M. Aldaz. 1998. Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene.* 17:199-205.

Brinkley, B.R. 2001. Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol.* 11:18-21.

Brust-Mascher, I., and J.M. Scholey. 2002. Microtubule flux and sliding in mitotic spindles of *Drosophila* embryos. *Mol Biol Cell.* 13:3967-75.

Bryant, J.E., K.G. Hutchings, R.K. Moyzis, and J.K. Griffith. 1997. Measurement of telomeric DNA content in human tissues. *Biotechniques.* 23:476-8, 480, 482, passim.

C

Cahill, D.P., C. Lengauer, J. Yu, G.J. Riggins, J.K. Willson, S.D. Markowitz, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1998. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *NATURE.* 392:300-3.

Caldwell, C.M., R.A. Green, and K.B. Kaplan. 2007. APC mutations lead to cytokinetic failures in vitro and tetraploid genotypes in Min mice. *J Cell Biol.* 178:1109-20.

- Camps, J., I. Ponsa, M. Ribas, E. Prat, J. Egozcue, M.A. Peinado, and R. Miro. 2005. Comprehensive measurement of chromosomal instability in cancer cells: combination of fluorescence in situ hybridization and cytokinesis-block micronucleus assay. *FASEB J.* 19:828-30.
- Capper, R., B. Britt-Compton, M. Tankimanova, J. Rowson, B. Letsolo, S. Man, M. Haughton, and D.M. Baird. 2007. The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells. *Genes Dev.* 21:2495-508.
- Carroll, P.E., M. Okuda, H.F. Horn, P. Biddinger, P.J. Stambrook, L.L. Gleich, Y.Q. Li, P. Tarapore, and K. Fukasawa. 1999. Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene.* 18:1935-44.
- Celli, G.B., and T. de Lange. 2005. DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat Cell Biol.* 7:712-8.
- Celli, G.B., E.L. Denchi, and T. de Lange. 2006. Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination. *Nat Cell Biol.* 8:885-90.
- Cimini, D., L.A. Cameron, and E.D. Salmon. 2004. Anaphase spindle mechanics prevent mis-segregation of merotelically oriented chromosomes. *Curr Biol.* 14:2149-55.
- Cimini, D., D. Fioravanti, E.D. Salmon, and F. Degrassi. 2002. Merotelic kinetochore orientation versus chromosome mono-orientation in the origin of lagging chromosomes in human primary cells. *J Cell Sci.* 115:507-15.
- Cimini, D., C. Tanzarella, and F. Degrassi. 1996. Effects of 5-azacytidine on the centromeric region of human fibroblasts studied by CREST staining and in situ hybridization on cytokinesis-blocked cells. *Cytogenet Cell Genet.* 72:219-24.
- Cimini, D., C. Tanzarella, and F. Degrassi. 1999. Differences in malsegregation rates obtained by scoring anaphases or binucleate cells. *Mutagenesis.* 14:563-8.
- Cimini, D., X. Wan, C.B. Hirel, and E.D. Salmon. 2006. Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors. *Curr Biol.* 16:1711-8.
- Collado, M., J. Gil, A. Efeyan, C. Guerra, A.J. Schuhmacher, M. Barradas, A. Benguria, A. Zaballos, J.M. Flores, M. Barbacid, D. Beach, and M. Serrano. 2005. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *NATURE.* 436:642.
- Counter, C.M., A.A. Avilion, C.E. LeFeuvre, N.G. Stewart, C.W. Greider, C.B. Harley, and S. Bacchetti. 1992. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J.* 11:1921-9.
- Crabbe, L., A. Jauch, C.M. Naeger, H. Holtgreve-Grez, and J. Karlseder. 2007. Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:2205-10.
- Crabbe, L., R.E. Verdun, C.I. Haggblom, and J. Karlseder. 2004. Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science.* 306:1951-3.
- Chin, K., C.O. de Solorzano, D. Knowles, A. Jones, W. Chou, E.G. Rodriguez, W.L. Kuo, B.M. Ljung, K. Chew, K. Myambo, M. Miranda, S. Krig, J. Garbe, M. Stampfer, P. Yaswen, J.W. Gray, and S.J. Lockett. 2004. In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nat Genet.* 36:984-8.

Chin, L., S.E. Artandi, Q. Shen, A. Tam, S.L. Lee, G.J. Gottlieb, C.W. Greider, and R.A. DePinho. 1999. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell*. 97:527-38.

Chiu, C.P., W. Dragowska, N.W. Kim, H. Vaziri, J. Yui, T.E. Thomas, C.B. Harley, and P.M. Lansdorp. 1996. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. *Stem Cells*. 14:239-48.

Chung, H.W., S.J. Kang, and S.Y. Kim. 2002. A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol. *Mutat Res*. 516:49-56.

D

d'Adda di Fagagna, F., P.M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N.P. Carter, and S.P. Jackson. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *NATURE*. 426:194-8.

Dai, W., Q. Wang, T. Liu, M. Swamy, Y. Fang, S. Xie, R. Mahmood, Y.M. Yang, M. Xu, and C.V. Rao. 2004. Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency. *Cancer Res*. 64:440-5.

Davoli, T., E.L. Denchi, and T. de Lange. 2010. Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy. *Cell*. 141:81-93.

de Lange, T. 2005. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 19:2100-10.

de Lange, T., L. Shiue, R.M. Myers, D.R. Cox, S.L. Naylor, A.M. Killery, and H.E. Varmus. 1990. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol*. 10:518-27.

De Leo, D., W. Padoani, P. Scocco, D. Lie, U. Bille-Brahe, E. Arensman, H. Hjelmeland, P. Crepet, C. Haring, K. Hawton, J. Lonnqvist, K. Michel, X. Pommereau, I. Querejeta, J. Phillipe, E. Salander-Renberg, A. Schmidtke, S. Fricke, B. Weinacker, B. Tamesvary, D. Wasserman, and S. Faria. 2001. Attempted and completed suicide in older subjects: results from the WHO/EURO Multicentre Study of Suicidal Behaviour. *Int J Geriatr Psychiatry*. 16:300-10.

Deng, W., S.W. Tsao, X.Y. Guan, and A.L. Cheung. 2007. Microtubule breakage is not a major mechanism for resolving end-to-end chromosome fusions generated by telomere dysfunction during the early process of immortalization. *Chromosoma*. 116:557-68.

DePinho, R.A. 2000. The age of cancer. *NATURE*. 408:248-54.

Difilippantonio, M.J., S. Petersen, H.T. Chen, R. Johnson, M. Jasin, R. Kanaar, T. Ried, and A. Nussenzweig. 2002. Evidence for replicative repair of DNA double-strand breaks leading to oncogenic translocation and gene amplification. *J Exp Med*. 196:469-80.

Dikovskaya, D., D. Schiffmann, I.P. Newton, A. Oakley, K. Kroboth, O. Sansom, T.J. Jamieson, V. Meniel, A. Clarke, and I.S. Nathke. 2007. Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *J Cell Biol*. 176:183-95.

Djojoseburoto, M.W., Y.S. Choi, H.W. Lee, and K.L. Rudolph. 2003. Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer. *Mol Cells*. 15:164-75.

Dobles, M., V. Liberal, M.L. Scott, R. Benezra, and P.K. Sorger. 2000. Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell*. 101:635-45.

Donehower, L.A., M. Harvey, B.L. Slagle, M.J. McArthur, C.A. Montgomery, Jr., J.S. Butel, and A. Bradley. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *NATURE*. 356:215-21.

Duelli, D.M., H.M. Padilla-Nash, D. Berman, K.M. Murphy, T. Ried, and Y. Lazebnik. 2007. A virus causes cancer by inducing massive chromosomal instability through cell fusion. *Curr Biol*. 17:431-7.

Duesberg, P., Rasnick 2000. Aneuploidy, the Somatic Mutation That Makes Cancer a Species of Its Own. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 47:81-107.

Dutrillaux, B., M. Gerbault-Seureau, Y. Remvikos, B. Zafrani, and M. Prieur. 1991. Breast cancer genetic evolution: I. Data from cytogenetics and DNA content. *Breast Cancer Res Treat*. 19:245-55.

E

Eastmond, D.A., and D. Pinkel. 1989. Aneuploidy detection by analysis of interphase nuclei using fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific probes. *Prog Clin Biol Res*. 318:277-84.

Elmore, L.W., C.W. Rehder, X. Di, P.A. McChesney, C.K. Jackson-Cook, D.A. Gewirtz, and S.E. Holt. 2002. Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. *J Biol Chem*. 277:35509-15.

Engelhardt, M., P. Drullinsky, J. Guillem, and M.A. Moore. 1997. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 3:1931-41.

Ernst, P. 1999. Review article: the role of inflammation in the pathogenesis of gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther*. 13 Suppl 1:13-8.

Espejel, S., S. Franco, S. Rodriguez-Perales, S.D. Bouffler, J.C. Cigudosa, and M.A. Blasco. 2002. Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *Embo J*. 21:2207-19.

Esteller, M. 2008. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 358:1148-59.

F

Farazi, P.A., J. Glickman, S. Jiang, A. Yu, K.L. Rudolph, and R.A. DePinho. 2003. Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 63:5021-7.

Feinberg, A.P., and B. Tycko. 2004. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 4:143-53.

Feinberg, A.P., and B. Vogelstein. 1983. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *NATURE*. 301:89-92.

Fenech, M. 2000. A mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division. *Mutagenesis*. 15:329-36.

Fenech, M. 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res*. 600:58-66.

Fenech, M., and A. Morley. 1985. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*. 43:233-46.

Ford, J.H., C.J. Schultz, and A.T. Correll. 1988. Chromosome elimination in micronuclei: a common cause of hypoploidy. *Am J Hum Genet*. 43:733-40.

Forgues, M., M.J. Difilippantonio, S.P. Linke, T. Ried, K. Nagashima, J. Feden, K. Valerie, K. Fukasawa, and X.W. Wang. 2003. Involvement of Crm1 in hepatitis B virus X protein-induced aberrant centriole replication and abnormal mitotic spindles. *Mol Cell Biol*. 23:5282-92.

Foulds, L. 1954. The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res*. 14:327-39.

Fujiwara, T., M. Bandi, M. Nitta, E.V. Ivanova, R.T. Bronson, and D. Pellman. 2005. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *NATURE*. 437:1043-7.

Fukasawa, K. 2002. Introduction. Centrosome. *Oncogene*. 21:6140-5.

Fukasawa, K. 2005. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett*. 230:6-19.

G

Galipeau, P.C., D.S. Cowan, C.A. Sanchez, M.T. Barrett, M.J. Emond, D.S. Levine, P.S. Rabinovitch, and B.J. Reid. 1996. 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:7081-4.

Ganem, N.J., S.A. Godinho, and D. Pellman. 2009. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *NATURE*. 460:278-82.

Garbe, J.C., C.R. Holst, E. Bassett, T. Tlsty, and M.R. Stampfer. 2007. Inactivation of p53 function in cultured human mammary epithelial cells turns the telomere-length dependent senescence barrier from agonescence into crisis. *Cell Cycle*. 6:1927-36.

Gatenby, R.A., and T.L. Vincent. 2003. An evolutionary model of carcinogenesis. *Cancer Res*. 63:6212-20.

Ghadimi, B.M., D.L. Sackett, M.J. Difilippantonio, E. Schrock, T. Neumann, A. Jauho, G. Auer, and T. Ried. 2000. Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations. *Genes Chromosomes Cancer*. 27:183-90.

Gisselsson, D. 2001. Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumours. *PNAS*. 98:12683-12688.

Gisselsson, D. 2002. Tumour morphology--interplay between chromosome aberrations and founder cell differentiation. *Histol Histopathol*. 17:1207-12.

- Gisselsson, D., U. Hakanson, P. Stoller, D. Marti, Y. Jin, A.H. Rosengren, Y. Stewenius, F. Kahl, and I. Panagopoulos. 2008. When the genome plays dice: circumvention of the spindle assembly checkpoint and near-random chromosome segregation in multipolar cancer cell mitoses. *PLoS One*. 3:e1871.
- Gisselsson, D., T. Jonson, C. Yu, C. Martins, N. Mandahl, J. Wiegant, Y. Jin, F. Mertens, and C. Jin. 2002. Centrosomal abnormalities, multipolar mitoses, and chromosomal instability in head and neck tumours with dysfunctional telomeres. *Br J Cancer*. 87:202-7.
- Gisselsson, D., E. Palsson, C. Yu, F. Mertens, and N. Mandahl. 2004. Mitotic instability associated with late genomic changes in bone and soft tissue tumours. *Cancer Lett*. 206:69-76.
- Gisselsson, D., L. Pettersson, M. Hoglund, M. Heidenblad, L. Gorunova, J. Wiegant, F. Mertens, P. Dal Cin, F. Mitelman, and N. Mandahl. 2000. Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:5357-62.
- Glotzer, M. 2001. Animal cell cytokinesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 17:351-86.
- Graakjaer, J., L. Pascoe, H. Der-Sarkissian, G. Thomas, S. Kolvraa, K. Christensen, and J.A. Londono-Vallejo. 2004. The relative lengths of individual telomeres are defined in the zygote and strictly maintained during life. *Aging Cell*. 3:97-102.
- Gray, J.W. 2003. Evidence emerges for early metastasis and parallel evolution of primary and metastatic tumors. *Cancer Cell*. 4:4-6.
- Greaves, M. 2002. Cancer causation: the Darwinian downside of past success? *Lancet Oncol*. 3:244-51.
- Greger, V., E. Passarge, W. Hopping, E. Messmer, and B. Horsthemke. 1989. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet*. 83:155-8.
- Greider, C.W., and E.H. Blackburn. 1987. The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*. 51:887-98.
- Griffin, C.S. 2002. Aneuploidy, centrosome activity and chromosome instability in cells deficient in homologous recombination repair. *Mutat Res*. 504:149-55.
- Griffin, C.S., P.J. Simpson, C.R. Wilson, and J. Thacker. 2000. Mammalian recombination-repair genes XRCC2 and XRCC3 promote correct chromosome segregation. *Nat Cell Biol*. 2:757-61.
- Griffith, J.D., L. Comeau, S. Rosenfield, R.M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, and T. de Lange. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 97:503-14.
- Gustafson, L.M., L.L. Gleich, K. Fukasawa, J. Chadwell, M.A. Miller, P.J. Stambrook, and J.L. Gluckman. 2000. Centrosome hyperamplification in head and neck squamous cell carcinoma: a potential phenotypic marker of tumor aggressiveness. *Laryngoscope*. 110:1798-801.

H

- Habedanck, R., Y.D. Stierhof, C.J. Wilkinson, and E.A. Nigg. 2005. The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nat Cell Biol*. 7:1140-6.
- Hackett JA, F.D., Greider CW. 2001. Telomere Dysfunction Increases Mutation Rate and Genomic Instability. *Cell*. 106:275-286.

- Hackett, J.A., D.M. Feldser, and C.W. Greider. 2001. Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell*. 106:275-86.
- Hahn, W.C., C.M. Counter, A.S. Lundberg, R.L. Beijersbergen, M.W. Brooks, and R.A. Weinberg. 1999. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *NATURE*. 400:464-8.
- Hanahan, D., G. Christofori, P. Naik, and J. Arbeit. 1996. Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur J Cancer*. 32A:2386-93.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100:57-70.
- Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *NATURE*. 345:458-60.
- Harrison, M., H.M. Magee, J. O'Loughlin, T.F. Gorey, and P.A. Dervan. 1995. Chromosome 1 aneusomy, identified by interphase cytogenetics, in mammographically detected ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol*. 175:303-9.
- Hasle, H., I.H. Clemmensen, and M. Mikkelsen. 2000. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet*. 355:165-9.
- Hastie, N.D., M. Dempster, M.G. Dunlop, A.M. Thompson, D.K. Green, and R.C. Allshire. 1990. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *NATURE*. 346:866-8.
- Hayflick, L. 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*. 37:614-36.
- Heddle, J.A. 1973. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat Res*. 18:187-90.
- Hegar, L.L., T. Orsiere, A. Botta, and V. Fessard. 2005. Okadaic acid: chromosomal non-disjunction analysis in human lymphocytes and study of aneuploidy pathway in CHO-K1 cells. *Mutat Res*. 578:53-63.
- Helleday, T., J. Lo, D.C. van Gent, and B.P. Engelward. 2007. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)*. 6:923-35.
- Hemann, M.T., M.A. Strong, L.Y. Hao, and C.W. Greider. 2001. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*. 107:67-77.
- Hoffelder, D.R., L. Luo, N.A. Burke, S.C. Watkins, S.M. Gollin, and W.S. Saunders. 2004. Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma*. 112:389-97.
- Holst, C.R., G.J. Nuovo, M. Esteller, K. Chew, S.B. Baylin, J.G. Herman, and T.D. Tlsty. 2003. Methylation of p16(INK4a) promoters occurs in vivo in histologically normal human mammary epithelia. *Cancer Res*. 63:1596-601.
- Holland, A.J., and D.W. Cleveland. 2009. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:478-87.
- Huang, H., L. Fletcher, N. Beeharry, R. Daniel, G. Kao, T.J. Yen, and R.J. Muschel. 2008. Abnormal cytokinesis after X-irradiation in tumor cells that override the G2 DNA damage checkpoint. *Cancer Res*. 68:3724-32.
- Huda, N., H. Tanaka, B.S. Herbert, T. Reed, and D. Gilley. 2007. Shared environmental factors associated with telomere length maintenance in elderly male twins. *Aging Cell*. 6:709-13.

Hut, H.M., W. Lemstra, E.H. Blaauw, G.W. Van Cappellen, H.H. Kampinga, and O.C. Sibon. 2003. Centrosomes split in the presence of impaired DNA integrity during mitosis. *Mol Biol Cell*. 14:1993-2004.

I

Imai, Y., Y. Shiratori, N. Kato, T. Inoue, and M. Omata. 1999. Mutational inactivation of mitotic checkpoint genes, hSMAD2 and hBUB1, is rare in sporadic digestive tract cancers. *Jpn J Cancer Res*. 90:837-40.

Iwasaki, H., and T. Suda. 2009. Cancer stem cells and their niche. *Cancer Sci*. 100:1166-72.

J

Jeanclous, E., N.J. Schork, K.O. Kyvik, M. Kimura, J.H. Skurnick, and A. Aviv. 2000. Telomere length inversely correlates with pulse pressure and is highly familial. *Hypertension*. 36:195-200.

Jeganathan, K., L. Malureanu, D.J. Baker, S.C. Abraham, and J.M. van Deursen. 2007. Bub1 mediates cell death in response to chromosome missegregation and acts to suppress spontaneous tumorigenesis. *J Cell Biol*. 179:255-67.

Jelluma, N., A.B. Brenkman, I. McLeod, J.R. Yates, 3rd, D.W. Cleveland, R.H. Medema, and G.J. Kops. 2008. Chromosomal instability by inefficient Mps1 auto-activation due to a weakened mitotic checkpoint and lagging chromosomes. *PLoS One*. 3:e2415.

Jin, Y., Y. Stewenius, D. Lindgren, A. Frigyesi, O. Calcagnile, T. Jonson, A. Edqvist, N. Larsson, L.M. Lundberg, G. Chebil, F. Liedberg, S. Gudjonsson, W. Mansson, M. Hoglund, and D. Gisselsson. 2007. Distinct mitotic segregation errors mediate chromosomal instability in aggressive urothelial cancers. *Clin Cancer Res*. 13:1703-12.

Johnson, R.D., and M. Jasin. 2000. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Embo J*. 19:3398-407.

Jonnalagadda, V.S., T. Matsuguchi, and B.P. Engelward. 2005. Interstrand crosslink-induced homologous recombination carries an increased risk of deletions and insertions. *DNA Repair (Amst)*. 4:594-605.

K

Karlseder, J., D. Broccoli, Y. Dai, S. Hardy, and T. de Lange. 1999. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science*. 283:1321-5.

Karlseder, J., A. Smogorzewska, and T. de Lange. 2002. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science*. 295:2446-9.

Kelleher, C., I. Kurth, and J. Lingner. 2005. Human protection of telomeres 1 (POT1) is a negative regulator of telomerase activity in vitro. *Mol Cell Biol*. 25:808-18.

Kim, H., O.H. Lee, H. Xin, L.Y. Chen, J. Qin, H.K. Chae, S.Y. Lin, A. Safari, D. Liu, and Z. Songyang. 2009. TRF2 functions as a protein hub and regulates telomere maintenance by recognizing specific peptide motifs. *Nat Struct Mol Biol.* 16:372-9.

Kim, N.W., M.A. Piatyszek, K.R. Prowse, C.B. Harley, M.D. West, P.L. Ho, G.M. Coviello, W.E. Wright, S.L. Weinrich, and J.W. Shay. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 266:2011-5.

Kinzler, K.W., and B. Vogelstein. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 87:159-70.

Kipling, D., and H.J. Cooke. 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *NATURE.* 347:400-2.

Kiyono, T., S.A. Foster, J.I. Koop, J.K. McDougall, D.A. Galloway, and A.J. Klingelutz. 1998. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *NATURE.* 396:84-8.

Kleinsmith, L. J. 2006. Principles of Cancer Biology. Pearson

Knudson, A.G., Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68:820-3.

Ko, M.A., C.O. Rosario, J.W. Hudson, S. Kulkarni, A. Pollett, J.W. Dennis, and C.J. Swallow. 2005. Plk4 haploinsufficiency causes mitotic infidelity and carcinogenesis. *Nat Genet.* 37:883-8.

Konopka, J.B., S.M. Watanabe, J.W. Singer, S.J. Collins, and O.N. Witte. 1985. Cell lines and clinical isolates derived from Ph1-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-abl proteins with a common structural alteration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:1810-4.

Konopka, J.B., and O.N. Witte. 1985. Activation of the abl oncogene in murine and human leukemias. *Biochim Biophys Acta.* 823:1-17.

Kops, G.J., D.R. Foltz, and D.W. Cleveland. 2004. Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:8699-704.

Krishnamurthy, J., M.R. Ramsey, K.L. Ligon, C. Torrice, A. Koh, S. Bonner-Weir, and N.E. Sharpless. 2006. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *NATURE.* 443:453-7.

Kura, S., H. Sasaki, R. Aramaki, and H. Yoshinaga. 1978. Binucleate cell formation induced by X irradiation. *Radiat Res.* 76:83-94.

L

Lansdorp, P.M., N.P. Verwoerd, F.M. van de Rijke, V. Dragowska, M.T. Little, R.W. Dirks, A.K. Raap, and H.J. Tanke. 1996. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet.* 5:685-91.

Latre, L., L. Tusell, M. Martin, R. Miro, J. Egozcue, M.A. Blasco, and A. Genesca. 2003. Shortened telomeres join to DNA breaks interfering with their correct repair. *Exp Cell Res.* 287:282-8.

Leber, B., B. Maier, F. Fuchs, J. Chi, P. Riffel, S. Anderhub, L. Wagner, A.D. Ho, J.L. Salisbury, M. Boutros, and A. Kramer. Proteins required for centrosome clustering in cancer cells. *Sci Transl Med.* 2:33ra38.

- Lechel, A., A. Satyanarayana, Z. Ju, R.R. Plentz, S. Schaetzlein, C. Rudolph, L. Wilkens, S.U. Wiemann, G. Saretzki, N.P. Malek, M.P. Manns, J. Buer, and K.L. Rudolph. 2005. The cellular level of telomere dysfunction determines induction of senescence or apoptosis in vivo. *EMBO Rep.* 6:275-81.
- Lei, M., E.R. Podell, and T.R. Cech. 2004. Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. *Nat Struct Mol Biol.* 11:1223-9.
- Lei, M., A.J. Zaugg, E.R. Podell, and T.R. Cech. 2005. Switching human telomerase on and off with hPOT1 protein in vitro. *J Biol Chem.* 280:20449-56.
- Lejnine, S., V.L. Makarov, and J.P. Langmore. 1995. Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:2393-7.
- Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1997. Genetic instability in colorectal cancers. *NATURE.* 386:623-7.
- Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *NATURE.* 396:643-9.
- Li, F.P., and J.F. Fraumeni, Jr. 1982. Prospective study of a family cancer syndrome. *JAMA.* 247:2692-4.
- Li, X., and R.B. Nicklas. 1995. Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *NATURE.* 373:630-2.
- Li, X.C., J.C. Schimenti, and B.K. Tye. 2009. Aneuploidy and improved growth are coincident but not causal in a yeast cancer model. *PLoS Biol.* 7:e1000161.
- Li, Y., J. Pan, J.L. Li, J.H. Lee, C. Tunkey, K. Saraf, J.C. Garbe, M.Z. Whitley, S.A. Jelinsky, M.R. Stampfer, and S.A. Haney. 2007. Transcriptional changes associated with breast cancer occur as normal human mammary epithelial cells overcome senescence barriers and become immortalized. *Mol Cancer.* 6:7.
- Lingle, W.L., and J.L. Salisbury. 1999. Altered centrosome structure is associated with abnormal mitoses in human breast tumors. *Am J Pathol.* 155:1941-51.
- Loayza, D., and T. De Lange. 2003. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature.* 423:1013-8.
- Loeb, L. 1991. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer research.* 51:3075-9.
- Loeb, L.A. 2001. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 61:3230-9.
- Londono-Vallejo, J.A. 2004. Telomere length heterogeneity and chromosome instability. *Cancer Lett.* 212:135-44.

M

- Maddox, P., A. Desai, K. Oegema, T.J. Mitchison, and E.D. Salmon. 2002. Poleward microtubule flux is a major component of spindle dynamics and anaphase a in mitotic *Drosophila* embryos. *Curr Biol.* 12:1670-4.
- Maddox, P., A. Straight, P. Coughlin, T.J. Mitchison, and E.D. Salmon. 2003. Direct observation of microtubule dynamics at kinetochores in *Xenopus* extract spindles: implications for spindle mechanics. *J Cell Biol.* 162:377-82.

Maffini, M.V., J.M. Calabro, A.M. Soto, and C. Sonnenschein. 2005. Stromal regulation of neoplastic development: age-dependent normalization of neoplastic mammary cells by mammary stroma. *Am J Pathol.* 167:1405-10.

Maiato, H., J. DeLuca, E.D. Salmon, and W.C. Earnshaw. 2004. The dynamic kinetochore-microtubule interface. *J Cell Sci.* 117:5461-77.

Maini, M.K., M.V. Soares, C.F. Zilch, A.N. Akbar, and P.C. Beverley. 1999. Virus-induced CD8+ T cell clonal expansion is associated with telomerase up-regulation and telomere length preservation: a mechanism for rescue from replicative senescence. *J Immunol.* 162:4521-6.

Makarov, V.L., Y. Hirose, and J.P. Langmore. 1997. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell.* 88:657-66.

Maley, C.C. 2007. Multistage carcinogenesis in Barrett's esophagus. *Cancer Lett.* 245:22-32.

Margolis, R.L., O.D. Lohez, and P.R. Andreassen. 2003. G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis. *J Cell Biochem.* 88:673-83.

Martens, U.M., V. Brass, L. Sedlacek, M. Pantic, C. Exner, Y. Guo, M. Engelhardt, P.M. Lansdorp, C.F. Waller, and W. Lange. 2002. Telomere maintenance in human B lymphocytes. *Br J Haematol.* 119:810-8.

Martinez, P., M. Thanasoula, P. Munoz, C. Liao, A. Tejera, C. McNees, J.M. Flores, O. Fernandez-Capetillo, M. Tarsounas, and M.A. Blasco. 2009. Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice. *Genes Dev.* 23:2060-75.

McClintock, B. 1939. The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25:405-16.

McDermott, K.M., J. Zhang, C.R. Holst, B.K. Kozakiewicz, V. Singla, and T.D. Tlsty. 2006. p16(INK4a) prevents centrosome dysfunction and genomic instability in primary cells. *PLoS Biol.* 4:e51.

Meeker, A.K., and P. Argani. 2004. Telomere shortening occurs early during breast tumorigenesis: a cause of chromosome destabilization underlying malignant transformation? *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 9:285-96.

Meeker, A.K., W.R. Gage, J.L. Hicks, I. Simon, J.R. Coffman, E.A. Platz, G.E. March, and A.M. De Marzo. 2002. Telomere length assessment in human archival tissues: combined telomere fluorescence in situ hybridization and immunostaining. *Am J Pathol.* 160:1259-68.

Meeker, A.K., J.L. Hicks, E. Gabrielson, W.M. Strauss, A.M. De Marzo, and P. Argani. 2004. Telomere shortening occurs in subsets of normal breast epithelium as well as in situ and invasive carcinoma. *Am J Pathol.* 164:925-35.

Melk, A., B.M. Schmidt, O. Takeuchi, B. Sawitzki, D.C. Rayner, and P.F. Halloran. 2004. Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int.* 65:510-20.

Mendoza, M., C. Norden, K. Durrer, H. Rauter, F. Uhlmann, and Y. Barral. 2009. A mechanism for chromosome segregation sensing by the NoCut checkpoint. *Nat Cell Biol.* 11:477-83.

Meraldi, P., V.M. Draviam, and P.K. Sorger. 2004a. Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev Cell.* 7:45-60.

- Meraldi, P., R. Honda, and E.A. Nigg. 2002. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *Embo J.* 21:483-92.
- Meraldi, P., R. Honda, and E.A. Nigg. 2004b. Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev.* 14:29-36.
- Merlo, A., J.G. Herman, L. Mao, D.J. Lee, E. Gabrielson, P.C. Burger, S.B. Baylin, and D. Sidransky. 1995. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med.* 1:686-92.
- Mertens, F., B. Johansson, M. Hoglund, and F. Mitelman. 1997. Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res.* 57:2765-80.
- Michel, L., R. Benezra, and E. Diaz-Rodriguez. 2004. MAD2 dependent mitotic checkpoint defects in tumorigenesis and tumor cell death: a double edged sword. *Cell Cycle.* 3:990-2.
- Michel, L.S., V. Liberal, A. Chatterjee, R. Kirchwegger, B. Pasche, W. Gerald, M. Dobles, P.K. Sorger, V.V. Murty, and R. Benezra. 2001. MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *NATURE.* 409:355-9.
- Montagna, C., E.R. Andrechek, H. Padilla-Nash, W.J. Muller, and T. Ried. 2002. Centrosome abnormalities, recurring deletions of chromosome 4, and genomic amplification of HER2/neu define mouse mammary gland adenocarcinomas induced by mutant HER2/neu. *Oncogene.* 21:890-8.
- Mullins, J.M., and J.J. Biesele. 1977. Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells. *J Cell Biol.* 73:672-84.

N

- Negrini, S., V.G. Gorgoulis, and T.D. Halazonetis. 2010. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:220-8.
- Nguyen, H.G., M. Makitalo, D. Yang, D. Chinnappan, C. St Hilaire, and K. Ravid. 2009. Deregulated Aurora-B induced tetraploidy promotes tumorigenesis. *FASEB J.* 23:2741-8.
- Nielsen, G.P., A.O. Stemmer-Rachamimov, J. Shaw, J.E. Roy, J. Koh, and D.N. Louis. 1999. Immunohistochemical survey of p16INK4A expression in normal human adult and infant tissues. *Lab Invest.* 79:1137-43.
- Nigg, E.A. 2002. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer.* 2:815-25.
- Nigg, E.A. 2006. Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers. *Int J Cancer.* 119:2717-23.
- Nishida, N., T. Nagasaka, K. Kashiwagi, C.R. Boland, and A. Goel. 2007. High copy amplification of the Aurora-A gene is associated with chromosomal instability phenotype in human colorectal cancers. *Cancer Biol Ther.* 6:525-33.
- Norden, C., M. Mendoza, J. Dobbelaere, C.V. Kotwaliwale, S. Biggins, and Y. Barral. 2006. The NoCut pathway links completion of cytokinesis to spindle midzone function to prevent chromosome breakage. *Cell.* 125:85-98.

Norrback, K.F., M. Hultdin, K. Dahlenborg, P. Osterman, R. Carlsson, and G. Roos. 2001. Telomerase regulation and telomere dynamics in germinal centers. *Eur J Haematol.* 67:309-17.

Nowell, P.C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 194:23-8.

O

O'Driscoll, M., and P.A. Jeggo. 2006. The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet.* 7:45-54.

O'Sullivan, J.N., M.P. Bronner, T.A. Brentnall, J.C. Finley, W.T. Shen, S. Emerson, M.J. Emond, K.A. Gollahon, A.H. Moskowitz, D.A. Crispin, J.D. Potter, and P.S. Rabinovitch. 2002. Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. *Nat Genet.* 32:280-4.

Ohashi, K., M. Tsutsumi, K. Kobitsu, T. Fukuda, T. Tsujiuchi, E. Okajima, S. Ko, Y. Nakajima, H. Nakano, and Y. Konishi. 1996. Shortened telomere length in hepatocellular carcinomas and corresponding background liver tissues of patients infected with hepatitis virus. *Jpn J Cancer Res.* 87:419-22.

Olesen, S.H., T. Thykjaer, and T.F. Orntoft. 2001. Mitotic checkpoint genes hBUB1, hBUB1B, hBUB3 and TTK in human bladder cancer, screening for mutations and loss of heterozygosity. *Carcinogenesis.* 22:813-5.

Olovnikov, A.M. 1973. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol.* 41:181-90.

P

Palm, W., and T. de Lange. 2008. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet.* 42:301-34.

Pandis, N., S. Heim, G. Bardi, I. Idvall, N. Mandahl, and F. Mitelman. 1993. Chromosome analysis of 20 breast carcinomas: cytogenetic multiclonality and karyotypic-pathologic correlations. *Genes Chromosomes Cancer.* 6:51-7.

Peloponese, J.M., Jr., K. Haller, A. Miyazato, and K.T. Jeang. 2005. Abnormal centrosome amplification in cells through the targeting of Ran-binding protein-1 by the human T cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:18974-9.

Pellestor, F., and P. Paulasova. 2004. The peptide nucleic acids (PNAs), powerful tools for molecular genetics and cytogenetics. *Eur J Hum Genet.* 12:694-700.

Pheesse, T.J., and A.R. Clarke. 2009. Normal stem cells in cancer prone epithelial tissues. *Br J Cancer.* 100:221-7.

Piel, M., J. Nordberg, U. Euteneuer, and M. Bornens. 2001. Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells. *Science.* 291:1550-3.

Pihan, G.A., J. Wallace, Y. Zhou, and S.J. Doxsey. 2003. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res.* 63:1398-404.

Podsypanina, K., Y.C. Du, M. Jechlinger, L.J. Beverly, D. Hambarzumyan, and H. Varmus. 2008. Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in the lung. *Science*. 321:1841-4.

Poon, S.S., U.M. Martens, R.K. Ward, and P.M. Lansdorp. 1999. Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry*. 36:267-78.

Povirk, L.F. 2006. Biochemical mechanisms of chromosomal translocations resulting from DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*. 5:1199-212.

Putkey, F.R., T. Cramer, M.K. Morpew, A.D. Silk, R.S. Johnson, J.R. McIntosh, and D.W. Cleveland. 2002. Unstable kinetochore-microtubule capture and chromosomal instability following deletion of CENP-E. *Dev Cell*. 3:351-65.

Q

Quintyne, N.J., J.E. Reing, D.R. Hoffelder, S.M. Gollin, and W.S. Saunders. 2005. Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science*. 307:127-9.

R

Radpour, R., Z. Barekati, M.M. Haghghi, C. Kohler, R. Asadollahi, P.M. Torbati, W. Holzgreve, and X.Y. Zhong. Correlation of telomere length shortening with promoter methylation profile of p16/Rb and p53/p21 pathways in breast cancer. *Mod Pathol*. 23:763-72.

Radpour, R., Z. Barekati, M.M. Haghghi, C. Kohler, R. Asadollahi, P.M. Torbati, W. Holzgreve, and X.Y. Zhong. 2010. Correlation of telomere length shortening with promoter methylation profile of p16/Rb and p53/p21 pathways in breast cancer. *Mod Pathol*. 23:763-72.

Ramirez, R.D., C.P. Morales, B.S. Herbert, J.M. Rohde, C. Passons, J.W. Shay, and W.E. Wright. 2001. Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev*. 15:398-403.

Rao, X., Y. Zhang, Q. Yi, H. Hou, B. Xu, L. Chu, Y. Huang, W. Zhang, M. Fenech, and Q. Shi. 2008. Multiple origins of spontaneously arising micronuclei in HeLa cells: direct evidence from long-term live cell imaging. *Mutat Res*. 646:41-9.

Raynaud, C.M., J. Hernandez, F.P. Llorca, P. Nuciforo, M.C. Mathieu, F. Commo, S. Delaloge, L. Sabatier, F. Andre, and J.C. Soria. 2009. DNA Damage Repair and Telomere Length in Normal Breast, Preneoplastic Lesions, and Invasive Cancer. *Am J Clin Oncol*.

Ricke, R.M., J.H. van Ree, and J.M. van Deursen. 2008. Whole chromosome instability and cancer: a complex relationship. *Trends Genet*. 24:457-66.

Rieder, C.L. 1982. The formation, structure, and composition of the mammalian kinetochore and kinetochore fiber. *Int Rev Cytol*. 79:1-58.

Rieder, C.L., R.W. Cole, A. Khodjakov, and G. Sluder. 1995. The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol.* 130:941-8.

Rieder, C.L., A. Schultz, R. Cole, and G. Sluder. 1994. Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *J Cell Biol.* 127:1301-10.

Ring, D., R. Hubble, and M. Kirschner. 1982. Mitosis in a cell with multiple centrioles. *J Cell Biol.* 94:549-56.

Rivera-Calzada, A., J.D. Maman, L. Spagnolo, L.H. Pearl, and O. Llorca. 2005. Three-dimensional structure and regulation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs). *Structure.* 13:243-55.

Rivera-Calzada, A., L. Spagnolo, L.H. Pearl, and O. Llorca. 2007. Structural model of full-length human Ku70-Ku80 heterodimer and its recognition of DNA and DNA-PKcs. *EMBO Rep.* 8:56-62.

Romanov, S. 2001. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature.* 409:633-637.

Romanov, S.R., B.K. Kozakiewicz, C.R. Holst, M.R. Stampfer, L.M. Haupt, and T.D. Tlsty. 2001. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature.* 409:633-7.

Rowley, J.D. 1973. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann Genet.* 16:109-12.

Rudolph, K.L., S. Chang, H.W. Lee, M. Blasco, G.J. Gottlieb, C. Greider, and R.A. DePinho. 1999. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell.* 96:701-12.

Rudolph, K.L., M. Millard, M.W. Bosenberg, and R.A. DePinho. 2001. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat Genet.* 28:155-9.

S

Salisbury, J.L. 2007. A mechanistic view on the evolutionary origin for centrin-based control of centriole duplication. *J Cell Physiol.* 213:420-8.

Salisbury, J.L., A.B. D'Assoro, and W.L. Lingle. 2004. Centrosome amplification and the origin of chromosomal instability in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 9:275-83.

Sandberg, A.A., and D.K. Hossfeld. 1970. Chromosomal abnormalities in human neoplasia. *Annu Rev Med.* 21:379-408.

Satge, D., A.J. Sasco, A. Chompret, D. Orbach, F. Mechinaud, B. Lacour, B. Rouillet, H. Martelli, C. Bergeron, Y. Bertrand, D. Lacombe, Y. Perel, P. Monteil, B. Nelken, A.I. Bertozzi, M. Munzer, J. Kanold, F. Bernard, M.J. Vekemans, and D. Sommelet. 2003. A 22-year French experience with solid tumors in children with Down syndrome. *Pediatr Hematol Oncol.* 20:517-29.

Sato, N., K. Mizumoto, M. Nakamura, N. Maehara, Y.A. Minamishima, S. Nishio, E. Nagai, and M. Tanaka. 2001. Correlation between centrosome abnormalities and chromosomal instability in human pancreatic cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet.* 126:13-9.

- Sato, N., K. Mizumoto, M. Nakamura, K. Nakamura, M. Kusumoto, H. Niiyama, T. Ogawa, and M. Tanaka. 1999. Centrosome abnormalities in pancreatic ductal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 5:963-70.
- Scadden, D.T. 2006. The stem-cell niche as an entity of action. *NATURE.* 441:1075-9.
- Schliekelman, M., D.O. Cowley, R. O'Quinn, T.G. Oliver, L. Lu, E.D. Salmon, and T. Van Dyke. 2009. Impaired Bub1 function in vivo compromises tension-dependent checkpoint function leading to aneuploidy and tumorigenesis. *Cancer Res.* 69:45-54.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutat Res.* 31:9-15.
- Schwartzman, J.M., R. Sotillo, and R. Benezra. 2010. Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nat Rev Cancer.* 10:102-15.
- Sgura, A., A. Antocchia, M.J. Ramirez, R. Marcos, C. Tanzarella, and F. Degrassi. 1997. Micronuclei, centromere-positive micronuclei and chromosome nondisjunction in cytokinesis blocked human lymphocytes following mitomycin C or vincristine treatment. *Mutat Res.* 392:97-107.
- Shackney, S.E., C.A. Smith, B.W. Miller, D.R. Burholt, K. Murtha, H.R. Giles, D.M. Ketterer, and A.A. Pollice. 1989. Model for the genetic evolution of human solid tumors. *Cancer Res.* 49:3344-54.
- Sharp, D.J., G.C. Rogers, and J.M. Scholey. 2000. Cytoplasmic dynein is required for poleward chromosome movement during mitosis in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol.* 2:922-30.
- Sharpless, N.E., S. Alson, S. Chan, D.P. Silver, D.H. Castrillon, and R.A. DePinho. 2002. p16(INK4a) and p53 deficiency cooperate in tumorigenesis. *Cancer Res.* 62:2761-5.
- Shay, J.W., and S. Bacchetti. 1997. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.* 33:787-91.
- Shay, J.W., O.M. Pereira-Smith, and W.E. Wright. 1991. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res.* 196:33-9.
- Sherr, C.J. 1996. Cancer cell cycles. *Science.* 274:1672-7.
- Shimizu, N., N. Itoh, H. Utiyama, and G.M. Wahl. 1998. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J Cell Biol.* 140:1307-20.
- Shimizu, N., T. Shimura, and T. Tanaka. 2000. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat Res.* 448:81-90.
- Shimizu, N., K. Shingaki, Y. Kaneko-Sasaguri, T. Hashizume, and T. Kanda. 2005. When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Exp Cell Res.* 302:233-43.
- Silkworth, W.T., I.K. Nardi, L.M. Scholl, and D. Cimini. 2009. Multipolar spindle pole coalescence is a major source of kinetochore mis-attachment and chromosome mis-segregation in cancer cells. *PLoS One.* 4:e6564.
- Sluder, G., and J.J. Nordberg. 2004. The good, the bad and the ugly: the practical consequences of centrosome amplification. *Curr Opin Cell Biol.* 16:49-54.
- Smogorzewska, A., and T. de Lange. 2002. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *Embo J.* 21:4338-48.
- Smogorzewska, A., J. Karlseder, H. Holtgreve-Grez, A. Jauch, and T. de Lange. 2002. DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Curr Biol.* 12:1635-44.

- Smogorzewska, A., B. van Steensel, A. Bianchi, S. Oelmann, M.R. Schaefer, G. Schnapp, and T. de Lange. 2000. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol.* 20:1659-68.
- Soler, D., A. Genesca, G. Arnedo, J. Egozcue, and L. Tusell. 2005. Telomere dysfunction drives chromosomal instability in human mammary epithelial cells. *Genes Chromosomes Cancer.* 44:339-50.
- Sonnenschein, C., and A.M. Soto. 2008. Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. *Semin Cancer Biol.* 18:372-7.
- Sotillo, R., E. Hernando, E. Diaz-Rodriguez, J. Teruya-Feldstein, C. Cordon-Cardo, S.W. Lowe, and R. Benezra. 2007. Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell.* 11:9-23.
- Southern, S.A., M.F. Evans, and C.S. Herrington. 1997. Basal cell tetrasomy in low-grade cervical squamous intraepithelial lesions infected with high-risk human papillomaviruses. *Cancer Res.* 57:4210-3.
- Spagnolo, L., A. Rivera-Calzada, L.H. Pearl, and O. Llorca. 2006. Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair. *Mol Cell.* 22:511-9.
- Steigemann, P., C. Wurzenberger, M.H. Schmitz, M. Held, J. Guizetti, S. Maar, and D.W. Gerlich. 2009. Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell.* 136:473-84.
- Stewenius, Y., L. Gorunova, T. Jonson, N. Larsson, M. Hoglund, N. Mandahl, F. Mertens, F. Mitelman, and D. Gisselsson. 2005. Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:5541-6.
- Storchova, Z., and C. Kuffer. 2008. The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *J Cell Sci.* 121:3859-66.
- Storchova, Z., and D. Pellman. 2004. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:45-54.
- Suizu, F., A. Ryo, G. Wulf, J. Lim, and K.P. Lu. 2006. Pin1 regulates centrosome duplication, and its overexpression induces centrosome amplification, chromosome instability, and oncogenesis. *Mol Cell Biol.* 26:1463-79.

T

- Teixeira, M.T., M. Arneric, P. Sperisen, and J. Lingner. 2004. Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and -nonextendible states. *Cell.* 117:323-35.
- Terradas, M., M. Martin, L. Tusell, and A. Genesca. 2010. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutat Res.*
- Thomas, P., K. Umegaki, and M. Fenech. 2003. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis.* 18:187-94.
- Thompson, S.L., and D.A. Compton. 2008. Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. *J Cell Biol.* 180:665-72.
- Tirnauer, J.S., J.C. Canman, E.D. Salmon, and T.J. Mitchison. 2002. EB1 targets to kinetochores with attached, polymerizing microtubules. *Mol Biol Cell.* 13:4308-16.

Tusell, L., D. Soler, M. Agostini, J. Pampalona, and A. Genesca. 2008. The number of dysfunctional telomeres in a cell: one amplifies; more than one translocate. *Cytogenet Genome Res.* 122:315-25.

U

Uetake, Y., and G. Sluder. 2004. Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a "tetraploidy checkpoint". *J Cell Biol.* 165:609-15.

V

van Steensel, B., and T. de Lange. 1997. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *NATURE.* 385:740-3.

Vogelstein, B., and K.W. Kinzler. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 10:789-99.

Vousden, K.H., and D.P. Lane. 2007. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:275-83.

W

Wang, X., Y.X. Zhou, W. Qiao, Y. Tominaga, M. Ouchi, T. Ouchi, and C.X. Deng. 2006. Overexpression of aurora kinase A in mouse mammary epithelium induces genetic instability preceding mammary tumor formation. *Oncogene.* 25:7148-58.

Watson, J.D. 1972. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol.* 239:197-201.

Weaver, B.A., Z.Q. Bonday, F.R. Putkey, G.J. Kops, A.D. Silk, and D.W. Cleveland. 2003. Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *J Cell Biol.* 162:551-63.

Weaver, B.A., and D.W. Cleveland. 2005. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell.* 8:7-12.

Weaver, B.A., A.D. Silk, C. Montagna, P. Verdier-Pinard, and D.W. Cleveland. 2007. Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer Cell.* 11:25-36.

Webster, M., K.L. Witkin, and O. Cohen-Fix. 2009. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *J Cell Sci.* 122:1477-86.

Weinberg, R.A. 1989. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 49:3713-21.

Weng, N.P., L. Granger, and R.J. Hodes. 1997. Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:10827-32.

Williams, B.R., V.R. Prabhu, K.E. Hunter, C.M. Glazier, C.A. Whittaker, D.E. Housman, and A. Amon. 2008. Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. *Science.* 322:703-9.

Wong, C., and T. Stearns. 2005. Mammalian cells lack checkpoints for tetraploidy, aberrant centrosome number, and cytokinesis failure. *BMC Cell Biol.* 6:6.

Wright, W.E., O.M. Pereira-Smith, and J.W. Shay. 1989. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 9:3088-92.

Wright, W.E., M.A. Piatyszek, W.E. Rainey, W. Byrd, and J.W. Shay. 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet.* 18:173-9.

Wright, W.E., and J.W. Shay. 1992. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol.* 27:383-9.

Y

Yang, Z., J. Loncarek, A. Khodjakov, and C.L. Rieder. 2008. Extra centrosomes and/or chromosomes prolong mitosis in human cells. *Nat Cell Biol.* 10:748-51.

Ye, J.Z., D. Hockemeyer, A.N. Krutchinsky, D. Loayza, S.M. Hooper, B.T. Chait, and T. de Lange. 2004. POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes Dev.* 18:1649-54.

Yu, R., W. Lu, J. Chen, C.J. McCabe, and S. Melmed. 2003. Overexpressed pituitary tumor-transforming gene causes aneuploidy in live human cells. *Endocrinology.* 144:4991-8.

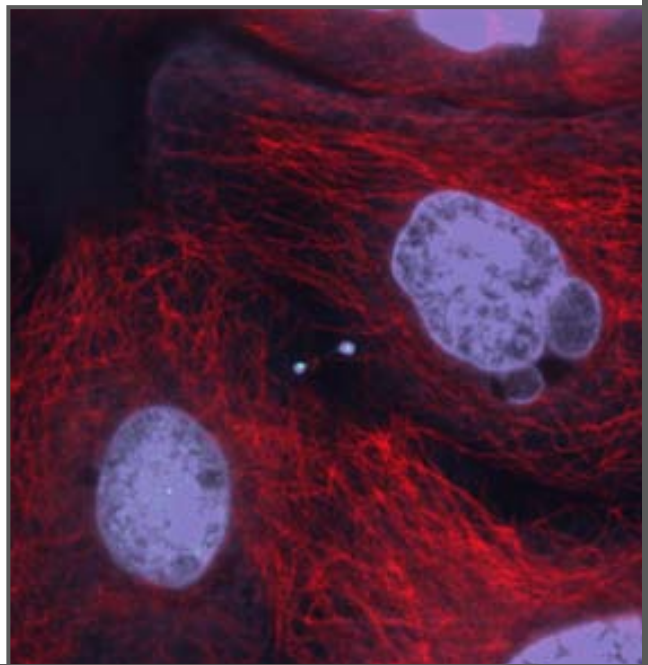
Z

Zhang, D., G.C. Rogers, D.W. Buster, and D.J. Sharp. 2007. Three microtubule severing enzymes contribute to the "Pacman-flux" machinery that moves chromosomes. *J Cell Biol.* 177:231-42.

Zhang, N., G. Ge, R. Meyer, S. Sethi, D. Basu, S. Pradhan, Y.J. Zhao, X.N. Li, W.W. Cai, A.K. El-Naggar, V. Baladandayuthapani, F.S. Kittrell, P.H. Rao, D. Medina, and D. Pati. 2008. Overexpression of Separase induces aneuploidy and mammary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:13033-8.

Zhao, Y., A.J. Sfeir, Y. Zou, C.M. Buseman, T.T. Chow, J.W. Shay, and W.E. Wright. 2009. Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. *Cell.* 138:463-75.

Agraiments



Recepta: agraïments de cruixent a la tesi doctoral

Ingredients:

per la base...

- Una Unitat de Biologia Cel·lular
- Un pessic de Laura Tusell i Anna Genescà
- Una cullerada sopera de David, Mariona, Marta Martín, Cristina Frías, Laia, Puri, Dani
- 100 grams de Marta Pladevall, Oscar, Nuno, Elisabet, Sergi, Irene, Tània, Albert
- 5 litres de Marta Farré, Zaida, Ester, Nerea, Assumpta, Pilar, Cris Campru, Sheila, Lidia, Anna Mallol, Anna Godó.
- 2 pessics de Marc, Jonathan i Sílvia
- 2 litres of Julio, Laura, Nathan, Karina, Gabriel, Brent, Maryam, Will, Muyao, Anthony, Isaac, Daniela
- 5 grapats de Joan, Elena, Carme, Leo, Josep, Montse, Fanny, Dolors

pel farcit...

- un laboratori de citogenètica i FISH
- una sala de microscopis
- un confocal
- molta salsa i bachata
- molt bones estones

Procediment:

Per què aquesta recepta sigui òptima s'han de combinar hores de treball i esforç amb els ingredients per a la base i el farcit. Quan estigui tot barrejat s'ha de deixar incubar de tres

anys a la unitat de biologia cel·lular, seguit d'un breu període de repòs a l'*Integrate life science building* de Blacksburg (VA, EUA). Per finalitzar, deixar reposar a la unitat de biologia cel·lular durant un any i mig més. I ja està llest per assaborir.

Punts a considerar:

1- La Laura Tusell i l'Anna Genescà són l'ingredient clau perquè el plat prengui el gust i la consistència apropiades. Quan vaig arribar em vareu brindar l'oportunitat d'unir-me al vostre grup, i des d'aleshores no he parat d'aprendre. Aix...i n'he passat de tots colors, des de les FISH impossibles fins als pòsters que després resultaren en comunicació oral en espanyol per acabar sent comunicació oral en anglès. Però gràcies al vostre suport sempre m'he n'he sortit! He buscat entre les paraules que escrites signifiquen gratitud i el que he trobat és un: Gràcies de tot cor.

2- El David i la Mariona són font de bons consells a seguir, merci per la vostra predisposició a ajudar, escoltar i "echar-nos unas risas". Als dos us estic agraïda perquè em vareu ajudar molt durant els meus inicis al laboratori, a més de compartir penes i glòries i milions d'hores fent FISH i Immunos!! Mariona gràcies al pack de Feng Shui que em vas regalar, vaig posar ordre a tot!!

3- Merci a la Cris Frías i a la Marta Martín perquè últimament els he estat usurpant l'ordenador. Cris, no oblidaré que tot i que feia 4 dies que havies arribat de los *Mandriles* em vas ensenyar Barcelona....a mi, que porto 5 anys vivint-hi...jeje!! Tampoc oblidaré aquella partida del Party & Co., a casa la Marta..., la qual vàrem guanyar, per cert....repetim quan vulguis.

4- Bueno bueno bueno, que he de dir del moment Judit que em brindaven el Nuno i l'Òscar cada tarda...Aquella època era el "pleno apogeo" del *Sing Star*, al qual vam treure molt profit (en aquest sentit hem de donar gràcies al germà petit del Sergi, el qual ens deixà desinteressadament tot el set, perquè poguéssim cantar). Memorables aquells cumplés de l'Eli, no oblidaré els duets amb la Marta Plade (por el amor de esta mujeeeeeeeeeeeeer...). Però el que sempre recordaré és l'Eli cantant l'alaska. I como no!! les competis per saber qui ho feia millor, si l'equip masculí format per Sergi/Nuno/Òscar/Santi o l'equip femení format per Marta/Eli/Ester/Jo. Evidentment

vàrem guanyar nosaltres! Tot plegat va culminar amb el Cabanabona party¹, que va ser la bomba!! no cal recordar-ho perquè hi ha 300000 fotos que il·lustren el que va passar.

5- Merci Marta Plade, per estar disposada a ajudar, no oblidaré el cap de setmana a l'Estartit!! M'ho vaig passar súper bé, l'estona que no estava sota els efectes de la Biodramina!!!!jeje

6- I les minivacances a Itàlia amb el Sergi van ser memorables. Mil partides a l'Uno, caminades amb sandàlies, i en ple sol, molta calor, paisatges inoblidables, fotos, diaris inacabats (o més ben dit, ni començats, no Sergi?? Jeje), bona cuina, platgeta, i gelats moooolts gelats!!!

7- Tot i que finalitzi aquesta etapa, em quedo tranquil·la perquè els que pugem ara, *véase* Irene, Tània, Albert, Dani, Anna Godó....sé del cert que també es sabeu divertir!! Així m'agrada, deixeu el llistó ben alt!!

8- Merci Puri per haver-me assessorat amb temes legals (jeje). I més important, merci per haver-me ensenyat el "sendero" secret. La veritat és que és un camí preciós....i he tingut la sort de conèixer-lo i fer-ne ús unes quantes vegades, abans de que acabi aquesta etapa.

9- Estic especialment orgullosa d'haver transmès la meva passió per la salsa a alguns membres d'aquesta gran família que és la Unitat de Biologia Cel·lular. Lidia, Laia, Anna Mallol i Marta Farré, ara sé del cert, que la propera vegada que sortim a ballar ja no passareu desapercebudes!! Ara només falta la Sheila perquè s'animi!! Bueno tu Lidia no n'has passat mai de desapercebuda, i no oblidaré que vas ser la primera víctima en acompanyar-me a ballar salsa, quan feia molt poquet que havia tornat dels Estats Units.

10- També estic molt agraïda a la Nerea, a la Zaida, a l'Ester, a l'Assumpta i a la Pilar, a la Cris Campru, que al principi de jo haver *aterrissat* a la unitat estaven sempre disposades a aconsellar i a donar un cop de ma.

11- Gràcies al Marc i a Jonathan, perquè sempre estan disposats a compartir les fórmules secretes de les solucions més complicades. I gràcies també a la Silvia, per estar sempre pendent de les nostres comandes i que ara espera un bebito!!! Felicitats guapa!.

12- Gràcies a tothom de la Unitat per ser tal com sou i per haver fet possible que l'estada per aquest departament hagi estat un plaer. No oblidaré les innumerables celebracions

que hem fet plegats, les bicicletades, les excursions a la muntanya, les esquiades i como no, les mudances (jeje, que no tothom pot dir que ha fet dues mudances en tant poc temps).

13- Thanks to Daniela to "adopt" in her lab, and for her useful advices and points of view. Thanks to Will to be patient with me and my mistakes. Muyao, Anthony, Isaac thanks for helping me whenever I needed.

14- Laura i Nathan and the cats thanks for adopting me so many times in your apartment, I'll never forget all those parties, trips and special moments that we shared, while I was here. Laura te echo mucho de menos!! Julito gracias por todas las birras al Rivermill y por sacarme a bailar salsa en el garito de nombre imposible: oge chi's (o como se llame)!!

15- Thanks to Karina, Gabriel, Brent, Maryam to be there whenever I needed!! Karina, I miss you, your advices, and your dancing!!! Gabri, I hope we can meet this summer!! Brent, you have to come to visit Barcelona!

16- També m'agradaria agrair el suport de l'Andrea i la Mire...merci per estar quan una ho necessita sou una gran companyia. I merci a l'Anna per posar els carrers cada matí al son de *Paso! Paso! Paso!*

17- I també al meu bombó: Sara gràcies per la teva aportació a aquesta tesi!!! I a la quinta de la Riuada! Oé Oé Oé!!!

Gràcies

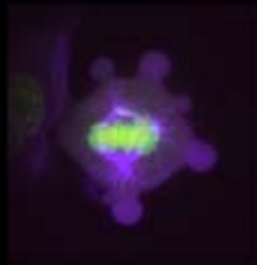
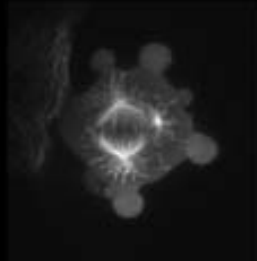
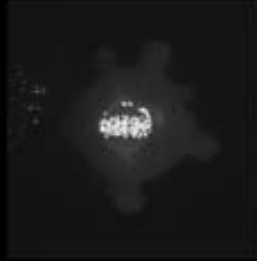
Gracias

Merci

Thank you

La Judit Pampalona Sala ha gaudit d'una beca del programa per a la formació de personal investigador (FI-2006), entre els anys 2005-2009, a més a més d'un ajut per a fer una estada en un centre de recerca estranger procedent del mateix programa (BE-2008). Actualment és beneficiària d'un contracte associat al projecte d'investigació RTICC RD06/0020/1020.

Aquest treball ha rebut el suport econòmic del Fons Social Europeu i del Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya.



MAIG 2010