

Curso 2012/13  
**CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/10**  
I.S.B.N.: 978-84-15910-68-8

**RAQUEL DOMÍNGUEZ KELLY**

**Identificación y caracterización de la quinasa Wee1  
como implicada en el mantenimiento  
de la estabilidad genómica**

**Director**  
**RAIMUNDO FREIRE BETANCOR**



**SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS**  
**Serie Tesis Doctorales**

## Agradecimientos

Siempre se dice que los agradecimientos son lo último que se escribe en una tesis, aunque, por mi parte, no hay un solo día en el que no haya recordado y recuerde lo afortunada que soy de contar con las personas con las que cuento en mi vida. Este espacio está dedicado a todas ellas.

En primer lugar, a mis padres. No hay palabras que puedan describir lo agradecida que estoy...por todo. Porque sin ustedes, no sólo no estaría en este mundo, sino tampoco escribiendo estas palabras en lo que constituye el final de una etapa de intenso crecimiento personal y profesional, a lo largo de la cual me han apoyado a cada paso, al igual que en todos los proyectos de mi vida. Por todos los “sí” y todos los “no”...muchas gracias. Son los mejores. Y a ti, Fer, por ser más que un hermano. Por ser mi amigo, mi confidente, uno de los pilares de mi vida, y por estar siempre ahí, sin importar dónde estemos. Por ser el mejor hermano del mundo. Gracias.

A Raimundo, por su entusiasmo. Por ser el “culpable” de que me enganchara a la investigación...aquello a lo que, al salir de la carrera, tenía claro que “no me quería dedicar”. Gracias por mostrarme lo equivocada que estaba. Por enseñarme a trabajar, a pensar y a superarme. Por tu paciencia y por invertir tiempo y esfuerzo en conocerme y sacar lo mejor de mí, y por tu ayuda en todo lo que ha estado en tu mano siempre. Y a Veronique, por ser el elemento equilibrador y una gota de cordura en momentos de caos. Por estar siempre dispuesta a discutir datos, comentar experimentos o compartir la crítica gastronómica de nuestros restaurantes favoritos. Gracias por esas palabras siempre adecuadas cuando más se necesitan.

A Eduardo, gracias por estar siempre dispuesto a ayudar y, especialmente, por el asesoramiento y los consejos para la elección de laboratorios de EE.UU, tanto para mi estancia como para la nueva etapa que ahora empieza.

A nuestros colaboradores, Rene Medema y Marvin Tanenbaum del Cancer Genomics Center de Utrecht, por el rastreo inicial con siRNA, y a Stephane

Koundrioukoff y Michelle Debatisse del Institut Curie de París, por su contribución con los experimentos de análisis de fibras de ADN.

A Michael, mi supervisor durante mi estancia en U.C. Berkeley, por haberme dado la oportunidad de conocer y formar parte de su equipo de trabajo, y a mis amigos del lab, Anna, Kate y Hermann, por acogerme tan cálidamente desde el primer día, por enseñarme tanto y por contribuir a que mi estancia en California haya sido una de las experiencias más importantes de mi vida. Anna, tú te mereces doble agradecimiento (y un monumento) por tu paciencia, tu ayuda y tu dedicación.\*

A Yusé...¡Por dónde empiezo! Has sido y eres un apoyo inmenso a muchos y muy diferentes niveles, y una de esas personas que una se siente orgullosa de tener en su vida. Gracias por tu siempre buena predisposición, tanto a resolver dudas y discutir experimentos, como a reorganizar el laboratorio o hacer una barbacoa. Estos años no habrían sido lo mismo sin ti.

A Juanra, gracias por tu entusiasmo y tu inestimable ayuda experta en los experimentos de proteómica. Y gracias , por supuesto, por los momentos de risas y aventura, colgando de una pared, saltando en un barranco o remando en medio de una tormenta.

A los chicos...a los que estaban cuando llegué, Antonio y Silvana, y a los que se quedan cuando me voy, Elisa, Hugo, Rocío y Santi, por el buen ambiente que siempre se respira en el laboratorio y por esos momentos de puesta en común de catástrofes experimentales que ayudan a relativizar los males y volver a intentarlo con más ganas. ¡Gracias a todos por ser unos pedazo de compañeros!

A “los otros chicos”, Ana, Isra y Javi, por los momentos de evasión, las conversaciones sobre cualquier cosa y los Viernes por la tarde. ¡Mucho ánimo en la recta final!

Al equipo “del otro lado”, Bárbara, Bea, Ceci, Cristi, Débora, Fátima y Montse. Gracias por hacer de la convivencia durante estos años una experiencia que recordar siempre con cariño.

A mis “otras dos mitades”, Vane y Bea. Por el simple hecho de estar, porque no concibo mi vida sin ustedes. Gracias por todos estos años de experiencias, aprendizaje y crecimiento, y espero que sigamos llenando páginas de anécdotas por muchos años más. A Javi e Ida, por hacer de los años de la carrera un cúmulo de momentos de los que aún hoy nos reímos al recordar. A Nao y Tania, mis amigas en el exilio. Porque aunque estén lejos, siempre las siento a mi lado. A Minaya, Mari, Ludy y Eva, por todas las cenas, conversaciones y momentos valiosos.

Y, por último, gracias a todas las personas que, sabiéndolo o no, han aportado un rayo de inspiración con sólo cruzarse en mi vida. Todas ellas me han enseñado algo, y de todas ellas me llevo un pequeño tesoro. Gracias.

\* To Michael, my supervisor during my stay at U.C. Berkeley, for giving me the opportunity to know and be part of his work team, and to my friends from the lab, Anna, Kate and Hermann, for taking me in so warmly from day one, for teaching me so much and for contributing to making my stay in California one of the most important experiences in my life. Anna, you deserve double appreciation (and a statue) for your patience, help and dedication. Honolulu loves you.



Este trabajo ha sido financiado a través de los proyectos SAF2007-64361 y SAF2010-22357 del Ministerio de Economía y Competitividad.

Raquel Domínguez Kelly ha sido becaria del programa de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad.

*“Dentro de veinte años estarás más decepcionado por las cosas que no hiciste que por las que hiciste. Así que suelta amarras. Navega lejos del puerto seguro. Atrapa el viento en tus velas. Explora. Sueña. Descubre.”*

**Mark Twain**

*A mis padres y mi hermano*

## **ÍNDICE DEL MANUSCRITO**

Abreviaturas

I. INTRODUCCIÓN, 1

II. OBJETIVOS, 31

III. RESULTADOS, 33

IV. DISCUSIÓN, 79

V. CONCLUSIONES, 91

VI. MATERIALES Y MÉTODOS, 93

VII. BIBLIOGRAFÍA, 117

# ÍNDICE DETALLADO

## Abreviaturas

## I. INTRODUCCIÓN, 1

1. *El ciclo celular, 1*
  - 1.1 *Fases G1 y S, 2*
  - 1.2 *Fases G2 y M, 5*
2. *La respuesta a daño en el ADN, 8*
  - 2.1 *Origen del daño, 8*
  - 2.2 *Vías de la respuesta a daño en el ADN, 10*
    - 2.2.1 *Vía de ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), 11*
    - 2.2.2 *Vía de ATR (ATM and Rad3 related), 13*
3. *Los puntos de control o checkpoints, 14*
  - 3.1 *El checkpoint G1/S, 15*
    - 3.1.1 *Mecanismo independiente de p53, 15*
    - 3.1.2 *Mecanismo dependiente de p53, 16*
  - 3.2 *El checkpoint de fase S, 16*
    - 3.2.1 *Mecanismo dependiente de Cdc25A, 17*
    - 3.2.2 *Mecanismo independiente de Cdc25A, 17*
  - 3.3 *El checkpoint G2/M, 18*
    - 3.3.1 *Mecanismo independiente de p53, 18*
    - 3.3.2 *Mecanismo dependiente de p53, 18*
  - 3.4 *Recuperación del checkpoint G2/M, 19*
4. *Wee1, 21*
  - 4.1 *Wee1 y Cdk2, 23*
5. *Reparación del daño en el ADN, 24*
  - 5.1 *BER: Reparación por escisión de bases, 25*
  - 5.2 *NER: Reparación por escisión de nucleótidos, 25*
  - 5.3 *MMS: Reparación de apareamientos erróneos, 26*
  - 5.4 *NHEJ: Unión de extremos no-homólogos, 26*
  - 5.5 *HR: Recombinación homóloga, 27*
    - 5.5.1 *Mus81-Eme1: Endonucleasa implicada en la reparación por recombinación homóloga, 28*

## II. OBJETIVOS, 31



### **III. RESULTADOS, 33**

1. *La ausencia de Wee1 causa la activación de la respuesta a daño en el ADN, 33*
  - 1.1 *La ausencia de Wee1 activa tanto de la vía de ATR como la de ATM, 35*
  - 1.2 *La inhibición de la actividad quinasa de Wee1 causa la fosforilación de la histona H2AX, 38*
2. *La inducción de la respuesta a daño en el ADN por la deficiencia de Wee1 tiene lugar en fase S, 39*
3. *La respuesta a daño en el ADN en ausencia de Wee1 no depende de Chk1, 43*
4. *La respuesta a daño en el ADN en ausencia de Wee1 no depende de Cdk1 pero sí de Cdk2, 45*
5. *Wee1 controla la velocidad de polimerización de la horquilla de replicación, 47*
6. *La deficiencia en la velocidad de replicación no causa un aumento significativo de  $\gamma$ -H2AX, 51*
7. *Wee1 y Chk1 realizan funciones similares, pero en vías diferentes, durante la replicación del ADN, 54*
8. *La ausencia de Wee1 afecta a la unión a cromatina de algunas proteínas de replicación, 56*
9. *La respuesta a daño en el ADN en ausencia de Wee1 depende de la endonucleasa Mus81-Eme1, 59*
10. *Mus81 está implicada en la respuesta a daño en ausencia de Wee1, pero no en la generada en ausencia de MCM4, 62*
11. *La eliminación conjunta de Wee1 y Mus81 restaura la progresión normal durante la fase S, 64*
12. *La ausencia de Wee1 no afecta la unión de Mus81 a la cromatina, 67*
13. *Wee1 interacciona con Mus81, 68*
14. *Wee1 fosforila a Mus81, 69*
15. *La tirosina 130 de Mus81 está fosforilada por Wee1, 70*
16. *Los mutantes Mus81 Y130F y Y130E se comportan como la proteína silvestre in vitro e in vivo, 74*
17. *Mus81 está fosforilada en la tirosina 423 y la serina 541, 75*
18. *Wee1 puede ser capaz de regular su propia actividad mediante autofosforilación, 76*

## **IV. DISCUSIÓN, 79**

1. *Búsqueda de nuevas quinasas implicadas en el mantenimiento de la estabilidad genómica, 79*
2. *Wee1 y Chk1 intervienen en el mantenimiento de la estabilidad genómica mediante vías distintas, 80*
3. *Implicación de Cdk2 y Mus81 en el fenotipo generado en ausencia de Wee1, 81*
  - 3.1 *Wee1 y Cdk2, 81*
  - 3.2 *Wee1 y Mus81, 82*
  - 3.3 *Wee1, Mus81 y Cdk2, 83*
4. *¿Cómo controla Wee1 a Mus81-Eme1?, 84*
5. *Regulación de Mus81-Eme1 durante el ciclo celular, 85*
6. *La quinasa Wee1 como potencial diana anticancerígena, 86*
7. *MCM4 en ausencia de Wee1, 88*
8. *Identificación de Wee1 como implicada en el mantenimiento de la estabilidad genómica, 89*

## **V. CONCLUSIONES, 91**

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS, 93**

1. *Análisis automatizado de inestabilidad genómica, 93*
2. *Líneas celulares, 93*
3. *Transfecciones, 94*
  - 3.1 *Transfección de plásmidos, 94*
  - 3.2 *Eliminación de la expresión de proteínas por ARN interferente (siRNA), 94*
  - 3.3 *Transfección conjunta de siRNA y plásmidos de ADN, 96*
4. *Plásmidos y clonaje, 96*
5. *Western blot, 80*
  - 5.1 *Lisis desnaturizante, 80*
  - 5.2 *Electroforesis, 98*
  - 5.3 *Transferencia y bloqueo, 98*
  - 5.4 *Anticuerpos, 99*
6. *Cuantificación de proteínas, 101*
  - 6.1 *Método del ácido bicinonínico, 101*

- 6.2 *Método de Bradford*, 102
- 7. *Inmunofluorescencia*, 102
- 8. *Inmunoprecipitación*, 104
  - 8.1 *Condiciones nativas*, 104
  - 8.2 *Condiciones desnaturalizantes*, 105
- 9. *Unión covalente de anticuerpos a resina de proteína A-sepharose*, 106
- 10. *Fraccionamiento de la cromatina*, 107
- 11. *Citometría de flujo*, 108
  - 11.1 *Tinción con yoduro de propidio*, 108
  - 11.2 *Tinción de la histona H2AX fosforilada ( $\gamma$ -H2AX)*, 109
- 12. *Viabilidad celular*, 110
- 13. *Inhibición de Wee1*, 111
- 14. *Ensayo quinasa in vitro*, 111
- 15. *Radiación UV*, 112
- 16. *Sincronizaciones*, 112
  - 16.1 *Sincronización en fase G1/S*, 112
  - 16.2 *Sincronización en mitosis*, 112
  - 16.3 *Sincronización en fase G2*, 113
- 17. *Ensayo de análisis de fibras de ADN*, 113
- 18. *Análisis proteómico*, 113
  - 18.1 *Preparación de muestras*, 113
  - 18.2 *Espectrometría de masas*, 114
  - 18.3 *Análisis de datos*, 114

## **VII. BIBLIOGRAFÍA, 117**

## Abreviaturas

- 53BP1:** proteína 1 de unión a p53 (en inglés *p53-binding protein 1*)
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- APC:** complejo promotor de la Anafase (en inglés *anaphase promoting complex*)
- APE1:** enzima AP endonucleasa 1
- ARN:** ácido ribonucleico
- ATM:** mutada en la ataxia telangiectasia (en inglés *ataxia telangiectasia mutated*)
- ATR:** relacionada con la ataxia telangiectasia y con Rad 3 (en inglés *ataxia telangiectasia mutated and rad 3 related*)
- ATRIP:** proteína de interacción con ATR (del inglés *ATR interacting protein*)
- BER:** reparación por escisión de base (en inglés *base excision repair*)
- BrdU:** 5-Bromodesoxiuridina
- CDC45:** proteína 45 de ciclo de división celular (en inglés *cell division cycle 45*)
- Cdk:** quinasa dependiente de ciclina (en inglés *cyclin dependent kinase*)
- Chk1:** quinasa del checkpoint 1 (en inglés *checkpoint kinase 1*)
- Chk2:** quinasa del checkpoint 2 (en inglés *checkpoint kinase 2*)
- CldU:** clorodesoxiuridina
- DAPI:** 4,6-diamidino-2-fenilindol
- GFP:** proteína verde fluorescente (en inglés *green fluorescent protein*)
- h:** horas
- H2AX:** histona 2A variante X
- HR:** recombinación homóloga (en inglés *homologous recombination*)
- HU:** hidroxurea
- IdU:** iododesoxiuridina
- IP:** inmunoprecipitación
- iWee1:** inhibidor de Wee1
- kD:** kilodalton
- kd:** mutante catalíticamente inactivo (en inglés *kinase dead*)
- MCM:** complejo de mantenimiento de mini-cromosomas (en inglés *mini-chromosome maintenance complex*)
- MMR:** reparación de apareamientos erróneos (en inglés *mismatch repair*)

**NER:** reparación por escisión de nucleótido (en inglés *nuclotide excision repair*)

**NHEJ:** unión de extremos no homólogos (en inglés *non-homologous end joining*)

**NRD:** dominio N-terminal con secuencias necesarias para la regulación negativa de la proteína (en inglés *amino-terminal regulatory domain*)

**ORC:** complejo de reconocimiento de los orígenes de replicación (en inglés *origin recognition complex*)

**PCNA:** antígeno nuclear de proliferación celular (en inglés *proliferating cell nuclear antigen*)

**PIKK:** quinasas relacionadas con la fosfatidil inositol 3 quinasa (en inglés *phosphatidyl inositol 3' kinase-related kinases*)

**pRB:** proteína de retinoblastoma

**RFC:** factor de replicación C (en inglés *replication factor C*)

**RI:** radiación ionizante

**RPA:** proteína de replicación A (en inglés *replication protein A*)

**siRNA:** ARN corto de interferencia (en inglés *Small Interfering RNA*)

**TopBP1:** Proteína 1 de unión a la topoisomerasa II (en inglés *topoisomerase II Binding protein 1*)

**UV:** radiación ultravioleta (en inglés *ultraviolet radiation*)

**WB:** *Western blot*

**wt:** versión silvestre (en inglés *wild type*)

**$\gamma$ -H2AX:** forma fosforilada de la Histona 2A variante X



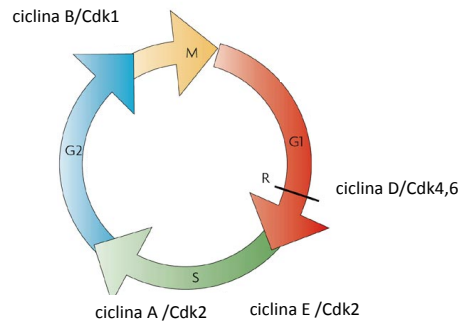
# I. INTRODUCCIÓN

## *1. El ciclo celular*

El ciclo celular es el conjunto de procesos que realiza la célula con el fin de dividirse y dar lugar a dos células hijas. En eucariotas consta de cuatro fases: G1, en la que la célula se prepara para copiar su material genético; S, en la que tiene lugar la replicación del ADN; G2, donde se verifica que éste se ha copiado correctamente y la célula se prepara para la segregación de las células hijas; y M, en la que finalmente éstas se separan.

La principal finalidad del ciclo celular es la transmisión del material genético a las células hijas de la manera más fidedigna posible. Para ello, es necesario un control exhaustivo de cada fase y de las transiciones entre ellas, lo que se realiza con máxima coordinación entre proteínas promotoras e inhibidoras de este proceso, que han de desarrollar su actividad estrictamente en el momento adecuado. Las principales moléculas encargadas de sincronizar y coordinar las transiciones entre las distintas fases son las quinasas dependientes de ciclina (Cdks), una familia de serina/treonina quinasas que, mediante su unión a subunidades reguladoras llamadas ciclinas, fosforilan y activan los sustratos necesarios para la progresión del ciclo celular.

En humanos existen hasta 13 Cdks (Malumbres & Barbacid, 2005) aunque sólo 4 (Cdk1, Cdk2, Cdk4 y Cdk6) están implicadas directamente en el control del ciclo celular. Sus niveles son bastante estables en todas las fases y son activas sólo cuando se encuentran unidas a ciclinas. Éstas, por el contrario, son expresadas en el momento del ciclo en el que ejercen su función y degradadas cuando ya no son necesarias (Murray, 2004). En mamíferos, Cdk4 y 6 se asocian a la ciclina D para atravesar el punto de restricción en fase G1, lo que implica la entrada irreversible en un nuevo ciclo celular desde el estado de quiescencia, también llamada fase G0. La entrada en S es promovida por Cdk2 unida a la ciclina E. Más adelante, durante la replicación, Cdk2 se une a la ciclina A y, finalmente, para la entrada en G2 y la ejecución de la mitosis, Cdk1 se asocia con la ciclina B.

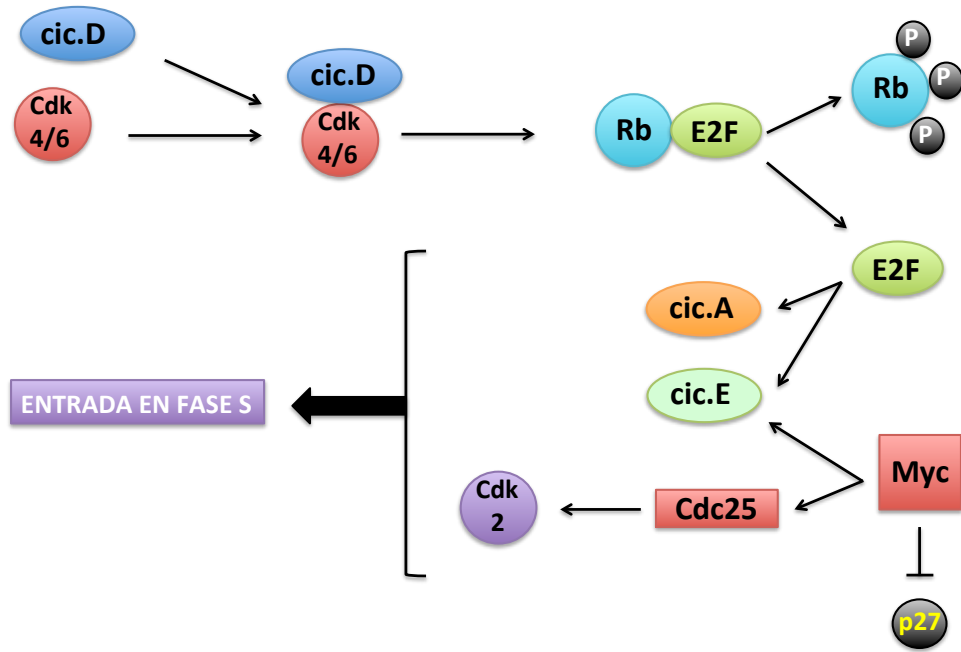


**Figura I 1:** Fases del ciclo celular, su regulación y complejos ciclina/Cdk implicados (adaptado de Dehay & Kennedy, 2007)

### 1.1 Fases G1 y S

En el control de la transición G1/S interviene la cascada de señalización formada por las proteínas p16, ciclina D, Cdk4 y 6, pRB y E2F. Todo comienza cuando el complejo activo ciclina D/Cdk4-6 (hasta entonces inhibido por p16) fosforila a la proteína de retinoblastoma pRB, liberando al factor de transcripción E2F, el cual induce la expresión de diversos genes que codifican proteínas promotoras de la entrada en S, como las ciclinas E y A (Bartek & Lukas, 2001).

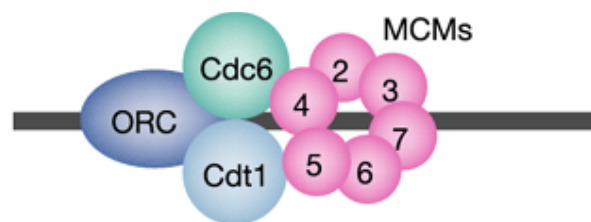
Además, esta transición está regulada positivamente por una ruta paralela en la que interviene el proto-oncogen Myc. Éste, un activador transcripcional, promueve entre otros, la expresión de genes codificantes para la ciclina E y la fosfatasa Cdc25A, que elimina la fosforilación inhibitoria de Cdk2 en su treonina 14 y su tirosina 15, paso esencial para su activación y, por tanto, para la entrada en la fase S. Por otro lado, Myc controla el ciclo celular de manera indirecta, interfiriendo en la actividad de p27, un potente inhibidor de Cdk2. Tras la activación de Myc, la rápida inducción de los complejos ciclina E/Cdk2 causa la fosforilación de p27 en su treonina 187, haciendo que se disocie selectivamente de éstos, pero quedando unido e inhibiendo a los complejos ciclina D/Cdk4. Finalmente, p27 es ubiquitinada y degradada vía proteosoma (Müller et al., 1997).



**Figura I 2:** Control de la transición G1/S

Durante la fase G1, fundamentalmente, tienen lugar los pasos previos a la replicación que preparan a la célula para copiar su material genético, una sola vez por ciclo celular.

El primer evento necesario para la replicación es el ensamblaje de los complejos de pre-replicación en la cromatina. Para ello, el complejo ORC (Orc1-6) o de reconocimiento de los orígenes de replicación, se une y activa esos sitios del ADN. Seguidamente, tendrá lugar el reclutamiento de dos factores de replicación, Cdc6 y Cdt1, necesarios para el ensamblaje del complejo MCM (MCM2-7), que posee la actividad helicasa que abre la doble hebra de ADN para que sirva como molde y así comience la replicación por las polimerasas.



**Figura I 3:** Complejo de pre-replicación (adaptado de Wiebusch, Uecker, & Hagemeyer, 2003)

Las Cdk2 y sus correspondientes ciclinas también están implicadas en el control del ensamblaje de los complejos de pre-replicación. Por ejemplo, el complejo ciclina E/Cdk2 promueve su formación fosforilando a Cdc6 y evitando su degradación. Por otro lado, el complejo ciclina A/Cdk2 está relacionado con la progresión en fase S, aunque juega también un papel importante evitando la reactivación de orígenes de replicación durante esta fase. Junto con Geminin, modulador de la actividad y estabilidad de factores de replicación (Caillat & Perrakis, 2012), previene la replicación múltiple de ciertas regiones del genoma (Jackman, Kubota, Elzen, Hagting, & Pines, 2002; Sclafani & Holzen, 2007).

Otro componente importante que controla la formación de los complejos pre-replicativos es APC o complejo promotor de la anafase. Se trata de un complejo con actividad E3 ligasa que interviene en la transición de mitosis a G1 y continúa su actividad durante esta fase. APC degrada a factores importantes para la entrada en fase S y, por tanto, ha de ser inhibido a final de G1, antes del comienzo de la fase de síntesis de ADN.

De este modo, durante la fase G1 la actividad de APC controla la degradación de la ciclina A, de Geminin y de Dbf4, subunidad reguladora de Cdc7, factor promotor de la fase S. Al final de G1, APC es inhibido por acción del complejo ciclina E/Cdk2 y de E2F, que induce la expresión de su inhibidor Emi1, de forma que el ciclo pueda continuar (Arata, Fujita, Ohtani, Kijima, & Kato, 2000; Zielke, Querings, Rottig, Lehner, & Sprenger, 2008; Zou & Stillman, 1998).

Al final de la fase G1 los niveles de ciclina E caen, mientras que los de ciclina A comienzan a subir y forman complejos activos con Cdk2, que se encargarán de asegurar la correcta progresión por la siguiente fase del ciclo celular, la fase S, donde tendrá lugar la síntesis del ADN.

Esta fase comienza cuando los complejos de pre-replicación están listos para iniciar la síntesis del ADN. Para ello, es necesaria la unión del factor de replicación Cdc45, que permite que la ADN polimerasa  $\alpha$  (polimerasa iniciadora) se cargue en el ADN para que comience la síntesis. Además, la procesividad de la replicación es incrementada gracias al antígeno nuclear de proliferación celular, PCNA, que con ayuda del factor replicativo-C

RFC, se dispone rodeando al ADN molde en forma de anillo homotrimérico al que se asocian las polimerasas (G. Zhang, Gibbs, Kelman, O'Donnell, & Hurwitz, 1999).

## *1.2 Fases G2 y M*

Cuando se ha completado la replicación del ADN la célula entra en fase G2, donde comprueba que el material genético se ha copiado correctamente y se prepara para la segregación de las cromátidas hermanas en las células hijas.

Durante esta fase, la actividad de ciclina A/Cdk2 continúa y va aumentando progresivamente la formación de los complejos ciclina B/Cdk1, aunque éstos permanecen inactivos gracias a la fosforilación inhibitoria de Cdk1 por Wee1 y Myt1 (Booher, Holman, & Fattaey, 1997; Haese, Walworth, Carr, & Gould, 1995).

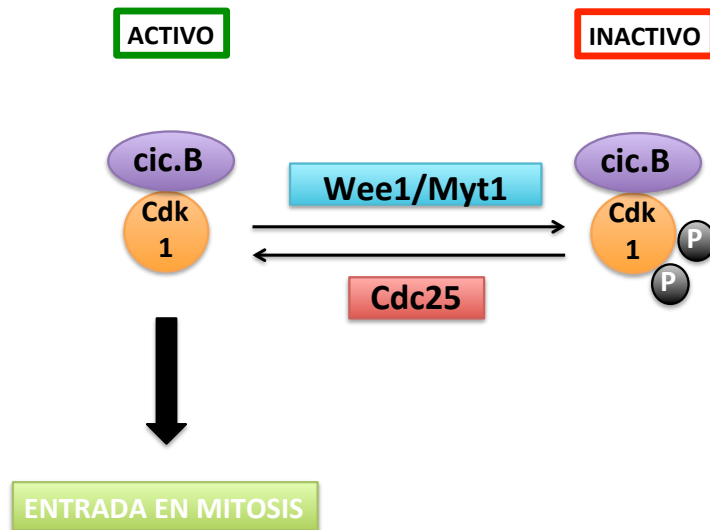
Para que tenga lugar esta transición, al final de la fase G2 dos eventos permiten la activación de Cdk1, principal promotora de la entrada en mitosis. Por un lado, tiene lugar la degradación de Wee1 por el complejo SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup>, que se explica con detalle más adelante (ver apartado *Recuperación del checkpoint G2/M*) y, por otro, la fosfatasa Cdc25 elimina la fosforilación inhibitoria de Cdk1 en su tirosina 15 y treonina 14.

Una vez la célula ha decidido entrar en mitosis y se ha producido la activación de los complejos ciclina B/Cdk1, se genera un bucle de retroalimentación positiva que asegura una rápida y completa activación del proceso, en donde interviene otra quinasa, Plk1, que junto con Cdk1 fosforila tanto a Cdc25, aumentando su actividad, como a Wee1, marcándola para su degradación (Watanabe et al., 2005).

Se han descrito tres isoformas de Cdc25: A, B y C (Donzelli & Draetta, 2003). El modelo más aceptado sitúa a las isoformas B y C como encargadas de promover la entrada en mitosis, donde Cdc25B actuaría primero, activando los complejos ciclina B/Cdk1 del citoplasma, y Cdc25C jugaría un papel posterior en la consecución de una activación completa e



irreversible. Cdc25A posee un papel más claro en la transición G1/S (ver apartado anterior), aunque existen estudios que también la sitúan en pasos posteriores del ciclo, como la transición G2/M (Mailand et al., 2002).



**Figura I 4:** Control del complejo ciclina B/Cdk1 en la transición G2/M

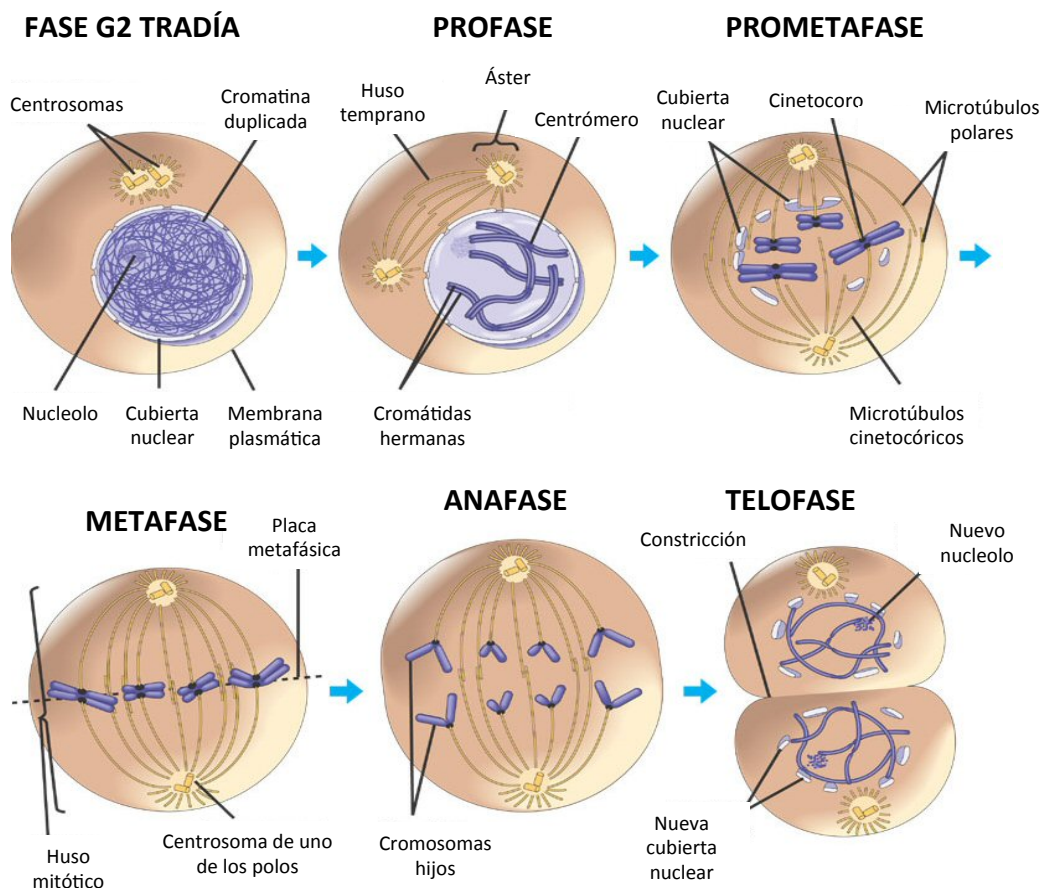
Al final de G2 el material genético se encuentra ya duplicado y listo para entrar en mitosis, donde tendrá lugar su segregación en dos células hijas idénticas.

Durante la primera fase de la mitosis o profase, el ADN de la célula se condensa en forma de cromátidas hermanas unidas por los centrómeros mediante la proteína cohesina. Este proceso es mediado por los complejos ciclina A/Cdk2, mientras que la ciclina B/Cdk1 interviene en pasos posteriores.

Durante fase S tiene lugar la duplicación de los centrosomas (Tsou & Stearns, 2006), cada uno con dos centriolos, que constituirán los centros organizadores de microtúbulos, elementos fundamentales durante todo el proceso de separación de las cromátidas hermanas durante la mitosis.

Seguidamente, tendrá lugar la formación del huso mitótico (prometafase), que une, mediante microtúbulos, a las cromátidas hermanas desde sus cinetocoros hasta los centriolos. Una vez éstas se hayan dispuesto en el

ecuador de la célula formando la placa metafásica (metafase), el huso mitótico será el encargado de su separación (anafase). En este proceso interviene la proteína Aurora A activada por Cdk1 (Van Horn et al., 2010), que promueve el reclutamiento de proteínas como  $\gamma$ -tubulina, que sirve de estructura para la polimerización de los microtúbulos; TACC, encargada de su estabilización; o kinesina 5, proteína motora implicada en el mantenimiento de la bipolaridad del huso. Además, Aurora A es necesaria para la alineación de los cromosomas en metafase y la separación de los centrómeros en anafase. Aurora A también participa en la salida de mitosis ayudando en el proceso citocinesis en telofase, donde se separan los citoplasmas de las dos células hijas. Durante este paso, los centriolos regresan a su posición original.



**Figura I 5:** Fases de la Mitosis

El complejo APC, mediante su actividad E3-ligasa y una vez activado por los complejos ciclina B/Cdk1 y Plk1, es el principal promotor de la progresión a través de la mitosis (Ubersax et al., 2003). En la primera parte

de la mitosis, se asocia a Cdc20 y media la degradación por proteosoma de la securina, proteína que mantiene unidas las cromátidas, y de las ciclinas A y B, lo que permite el avance en el ciclo. Ya en anafase se une a Cdh1 y degrada a Cdc20 y a las quinasas mitóticas Plk1 y Aurora A, promoviendo las últimas etapas de este proceso y, finalmente, la salida de mitosis (Peters, 2002).

## ***2. La respuesta a daño en el ADN***

### *2.1 Origen del daño*

El genoma de todos los seres vivos está continuamente expuesto a sufrir lesiones de distinta naturaleza. La célula ha desarrollado una compleja red de mecanismos con el fin de evitar la transmisión del material genético dañado a las células hijas, ya que esto supondría una desventaja evolutiva que podría comprometer la supervivencia de los organismos (S. P. Jackson & Bartek, 2009), aumentando su susceptibilidad a desarrollar patologías relacionadas con la acumulación de mutaciones, como es el caso del cáncer.

Estas amenazas pueden proceder del exterior de la célula, como agentes químicos o radiaciones, o de su interior, como productos del propio metabolismo celular. Las radiaciones ultravioleta e ionizante son las que se encuentran mejor descritas. La radiación ultravioleta (UVA, UVB, UVC) induce la formación de enlaces covalentes entre las bases del ADN, dando lugar a dímeros de pirimidina tipo ciclobutano (CPDs) y fotoproductos 6-4 (Sinha & Häder, 2002), que pueden generar mutaciones e incluso el bloqueo de las maquinarias de transcripción y replicación (Batista, Kaina, Meneghini, & Menck, 2009; Jiang et al., 2009). La radiación ionizante tiene la propiedad de alterar la configuración electrónica de ciertos compuestos, generando especies reactivas del oxígeno que son altamente inestables y pueden romper los enlaces fosfodiéster entre las ribosas, causando roturas de cadena sencilla y de la doble hebra del ADN (Little, 1968; Sowa, Arthurs, Estes, & Morgan, 2006). Estas moléculas altamente reactivas también pueden proceder de fuentes externas distintas a la radiación, como agentes cancerígenos, drogas quimioterapéuticas, etc.,

pero su origen más frecuente es el propio metabolismo celular, concretamente la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

De todas estas amenazas, la más severa es la formación de roturas de la doble hebra del ADN, ya que puede llevar a translocaciones y fusiones de cromosomas que no segregarán bien en mitosis, o incluso algunos fragmentos del material genético pueden llegar a perderse. Esto puede culminar en la muerte de la célula si la pérdida es muy grave, pero en otros casos, la falta de genes implicados, por ejemplo, en la supresión tumoral puede conllevar a la transformación de una célula normal en cancerosa. Por ello, la transición a mitosis es un momento crucial en el que la célula es especialmente sensible a acumular daño de forma irreversible. Otro momento en el que aumenta la vulnerabilidad de las células a sufrir daño es la replicación. La integridad del genoma puede verse amenazada cuando la horquilla se bloquea al encontrar un obstáculo en el ADN, ya que esto podría llevar a la formación de roturas en el genoma (Dronkert & Kanaar, 2001).

Paradójicamente, la sensibilidad a daño en el DNA de células en división activa ha sido aprovechada durante décadas para el desarrollo de fármacos que ataquen de manera selectiva a las células cancerígenas, cuya principal característica es una proliferación anormalmente elevada. De esta forma, muchas terapias contra el cáncer tienen como finalidad causar la muerte celular por saturación de daño durante la replicación, gracias a la acción de agentes genotóxicos. Por ejemplo, una importante diana de estas terapias son las Topoisomerasas I y II. Estas enzimas liberan la tensión generada por delante de la horquilla de replicación cuando las helicasas desenrollan el ADN para que sea copiado, proceso en el que generan cortes transitorios que luego religan. Por ello, si su actividad falla, estos cortes pueden pasar a ser permanentes y muy perjudiciales para la célula (D'Arpa, Beardmore, & Liu, 1990), pudiendo conducir a la muerte celular por apoptosis.

Otros agentes quimioterapéuticos que, en este caso, ejercen su acción inhibiendo la síntesis del ADN, son la hidroxiaurea, cuyo mecanismo de acción está relacionado con la reducción de la producción de desoxiribonucleótidos a través de la inhibición de la ribonucleótido reductasa (Strouse & Heeney, 2012; Yarbro, 1992), y la afidicolina, que

inhibe directamente a las ADN polimerasas  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (Cheng & Kuchta, 1993; Ikegami et al., 1978; Yamada & Itoh, 1994), bloqueando a la célula en fase S temprana.

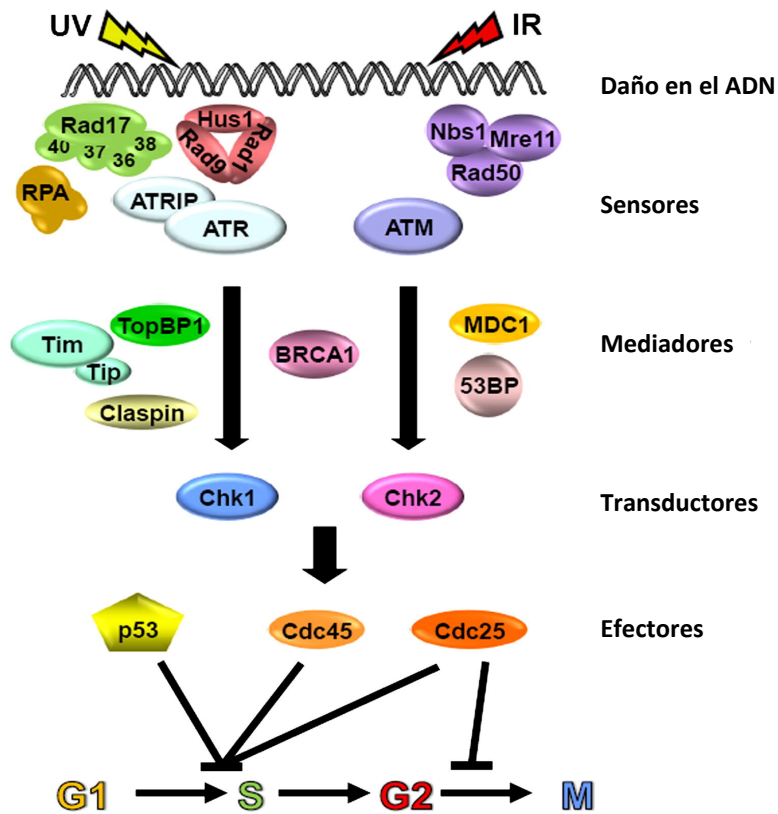
En cualquier caso, en la lucha contra el cáncer es de suma importancia alcanzar el máximo conocimiento de los diferentes tipos de daño que puede sufrir el ADN y las respuestas que se desencadenan en la célula, de manera que se puedan diseñar tratamientos cada vez más personalizados y efectivos para cada tipo de enfermedad.

## *2.2 Vías de la respuesta a daño en el ADN*

Cuando se produce una lesión en el ADN, se inducen en la célula una serie de procesos que pueden conducir a la reparación del daño, a la parada del ciclo celular, a la transcripción de determinados genes o, en último caso, a la muerte celular (Harper & Elledge, 2007), todo ello para evitar que el daño sea transmitido a las células hijas.

La respuesta a daño en el ADN implica la actuación de proteínas que funcionan como sensores que detectan físicamente el daño, transductores que transmiten y amplifican la señal, y efectores que activan a diferentes componentes de la respuesta (B. B. Zhou & Elledge, 2000). Estas proteínas se agrupan en dos vías fundamentales encabezadas por dos importantes quinasas pertenecientes a la familia de las PIKK (del inglés *phosphatidylinositol-3-kinase-like kinases*). Éstas son ATM y ATR, y sus sustratos fundamentales son las quinasas efectoras Chk2 y Chk1, respectivamente.





**Figura I 6:** Esquema general de la respuesta a daño en el ADN (adaptado de Sancar et al., 2010)

La vía ATM-Chk2 se activa principalmente por roturas de la doble hebra del ADN, mientras que la vía ATR-Chk1 responde a estímulos variados, como radiación ultravioleta, estrés replicativo o, también, roturas de la doble hebra (Cimprich & Cortez, 2008; Khanna & Jackson, 2001; Shiloh, 2003).

La activación de las quinasas ATM/ATR junto con sus sustratos Chk2/Chk1, conduce a la reducción de la actividad de las Cdks por diversos mecanismos, con el fin último de ralentizar o, incluso, bloquear la progresión del ciclo hasta que el problema haya sido subsanado. Estas paradas o *checkpoints* tienen lugar en la transición G1/S, dentro de la fase S o en la transición G2/M, y son revertidas una vez la célula está lista para continuar con su división. Por otro lado, estas vías también sirven para señalar la reparación del daño, si ésta es posible, o activar programas de parada permanente del ciclo (senescencia) o muerte celular programada (apoptosis), si el daño es demasiado severo (S. P. Jackson & Bartek, 2009).

### 2.2.1 *Vía de ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated)*

La activación de la quinasa ATM es el primer paso en la inducción de la respuesta a roturas de la doble hebra del ADN. La mutación de este gen deriva en la incapacidad de las células a responder ante este tipo de lesiones, causando en humanos un síndrome neurodegenerativo llamado ataxia telangiectasia. Los individuos afectados presentan, entre otros síntomas, dificultad en la coordinación de movimientos (ataxia periférica), dilatación de los capilares sanguíneos (telangiectasia), debilidad del sistema inmune y predisposición a distintos tipos de cáncer (Savitsky et al., 1995).

Uno de los primeros eventos que tienen lugar en la respuesta a daño mediada por ATM es la detección de la rotura del ADN por el complejo MRN (Mre11, Rad50 y Nbs1), que se une estabilizando el sitio de la lesión y permite el reclutamiento de ATM, el cual pasa entonces de dímero inactivo a monómero activo (You, Chahwan, Bailis, Hunter, & Russell, 2005) gracias a su autofosforilación en la serina 1981. Una vez activo, fosforila a una amplia variedad de sustratos entre los que se encuentra la histona H2AX que, al ser fosforilada en su serina 139 ( $\gamma$ -H2AX), servirá para el reclutamiento de importantes proteínas en esta vía, como MDC1, considerada una reguladora clave en este proceso (C. Lukas et al., 2004).

Se cree que MDC1 es la encargada de proteger la fosforilación de la histona hasta que ya no sea necesaria (Stewart, Wang, Bignell, Taylor, & Elledge, 2003; Stucki et al., 2005) y de promover reordenamientos en la cromatina que permiten crear un microentorno susceptible a la unión de otras proteínas mediadoras e implicadas en reparación, como 53BP1 y BRCA1 (Bekker-Jensen et al., 2006; Lou, Chini, Minter-Dykhouse, & Chen, 2003), que además se acompleja con Rap80 y ABRA1 (H. Kim, Chen, & Yu, 2007; Sobhian et al., 2007; B. Wang et al., 2007; Yan et al., 2007).

MDC1 sirve de anclaje para la ubiquitin-ligasa RNF8 que, junto con la conjugasa Ubc13, inicia una cascada de ubiquitinación en respuesta a daño marcando a las histonas H2A y  $\gamma$ -H2AX con ubiquitina, lo que sirve de señalización para otras moléculas mediadoras y reparadoras (Huyen et al., 2004; Kolas et al., 2007; Mailand et al., 2007). Así, la ubiquitin-ligasa

RNF168 prosigue con la formación de estas cadenas de ubiquitina (Doil et al., 2009; Stewart et al., 2009) que serán reconocidas por Rap80 para el reclutamiento de BRCA1 con ABRA1 como adaptador (Huen et al., 2007; Kolas et al., 2007; Mailand et al., 2007; B. Wang et al., 2007). BRCA1 juega un papel central en el mantenimiento de la estabilidad genómica al estar implicada tanto en la parada del ciclo celular, como en diversas vías de reparación del ADN (Le Page et al., 2000; Somasundaram, 2003; J. Wu, Lu, & Yu, 2010).

Otros sustratos importantes de ATM son p53 y Chk2 (Ashcroft, Kubbutat, & Vousden, 1999; Bahassi, Myer, McKenney, Hennigan, & Stambrook, 2006; Ryan, Phillips, & Vousden, 2001), cuya implicación en la parada del ciclo celular se explica con detalle más adelante (ver apartado *Puntos de control o checkpoints*).

### 2.2.2 Vía de ATR (*ATM and Rad3 related*)

Una mutación en el exón 9 del gen que codifica para ATR está relacionada con el desarrollo de una enfermedad poco común (1 de cada 10.000 personas) llamada síndrome Seckel o enanismo de cabeza de pájaro. Se caracteriza por un severo retardo en el crecimiento pre y postnatal, lo que conduce a un pronunciado enanismo, distintas anormalidades físicas y retraso mental. Esta mutación produce una alteración en el *splicing* que conduce a una forma truncada de la proteína, de modo que estos individuos poseen sólo un 5% de los niveles normales de la proteína ATR (Griffith et al., 2008; O'Driscoll, Gennery, Seidel, Concannon, & Jeggo, 2004; O'Driscoll, Ruiz-Perez, Woods, Jeggo, & Goodship, 2003).

La activación de ATR ocurre tras la detección de regiones de ADN monocatenario (López-Contreras & Fernández-Capetillo, 2010) generadas por el bloqueo de horquillas de replicación, o como parte del mecanismo de reparación de roturas de la doble hebra (Mimitou & Symington, 2009; Zou & Elledge, 2003).

En el caso de horquillas de replicación bloqueadas, ATR interviene en su estabilización evitando su colapso, induciendo la parada del ciclo celular y

permitiendo la reanudación de la replicación una vez reparado el daño (Paulsen & Cimprich, 2007).

Cuando la horquilla encuentra un obstáculo en el molde, se produce una descoordinación entre la maquinaria de replicación y la helicasa que desenrolla la doble hebra del ADN por delante de ella, y se generan regiones monocatenarias que son cubiertas y estabilizadas rápidamente por la proteína de unión a cadena sencilla de ADN, RPA (del inglés *replication protein A*) (Walter & Newport, 2000) la cual, además, se encarga de reclutar a ATR unido a ATRIP (*ATR interacting protein*, en inglés), con la que normalmente se encuentra formando un dímero inactivo (Zou & Elledge, 2003).

De manera independiente a RPA y ATR-ATRIP, el complejo 9-1-1 formado por Rad9, Rad1 y Hus1, se ancla alrededor del ADN gracias a la acción de Rad17 (Bao et al., 2001), y atrae a la zona de lesión a TopBP1, proteína necesaria para la activación de ATR. Finalmente, la proteína adaptadora Claspin permite la fosforilación y activación de la quinasa efectora Chk1 por ATR (X. Wang et al., 2006).

La activación de esta vía también puede ocurrir independientemente de la replicación, como parte de distintos procesos de reparación del ADN. En el procesamiento de roturas de la doble hebra por recombinación homóloga en las fases S y G2, CtIP (Sartori et al., 2007) y Exo1 (Bolderson et al., 2010) llevan a cabo la resección de los extremos bicatenarios, generando regiones monocatenarias de ADN que serán cubiertas por RPA. Por otro lado, la reparación de lesiones inducidas por radiación UV mediante el mecanismo NER, de escisión de nucleótidos (*nucleotide excision repair*, en inglés) también genera regiones de ADN monocatenario (Shell et al., 2009) (ver apartado *Reparación del daño en el ADN*).

### ***3. Los puntos de control o checkpoints***

Como hemos mencionado anteriormente, durante el ciclo celular existen varios momentos en los que la célula comprueba si todo está en orden y es posible continuar con la división celular o si, por el contrario, existe algún

problema y es necesario parar el ciclo hasta solventarlo, todo esto con el fin de evitar la transmisión de un material genético dañado a las células hijas. Por ello, un fallo en estas vías puede conllevar a la acumulación de mutaciones y aberraciones cromosómicas que conducirán a malformaciones y/o enfermedades genéticas (Hartwell & Kastan, 1994; Khanna & Jackson, 2001). Estos *checkpoints* inducen la rápida parada del ciclo hasta que la reparación se haya completado, momento en el que se reinicia la progresión en un proceso llamado recuperación del *checkpoint* (Duursma & Cimprich, 2010).

Aunque, en general, las dos vías de respuesta a daño en el ADN, ATR-Chk1 y ATM-Chk2, responden a distintos tipos de daño y se activan en distintas fases, la realidad es que existe solapamiento entre ambas, especialmente en los primeros pasos de la respuesta a daño. Es en los efectores y en sus dianas donde se pueden hacer distinciones algo más claras entre los *checkpoints* de G1/S, S o G2/M (Kastan & Lim, 2000; Khanna & Jackson, 2001; Shiloh, 2001; B. B. Zhou & Elledge, 2000).

### 3.1 El *checkpoint* G1/S

La activación del *checkpoint* de G1/S puede realizarse por dos mecanismos que poseen inicios comunes y conllevan a la parada del ciclo por inhibición de Cdk2, pero difieren en la rapidez del proceso.

#### 3.1.1 Mecanismo independiente de p53

La rápida inducción de esta parada en respuesta a daño es independiente de la activación de la transcripción y síntesis de proteínas reguladoras. En ella está implicada la degradación vía proteosoma e inducida por daño de la fosfatasa Cdc25A. Tras la inducción de daño por radiación UV o ionizante, Chk1 y Chk2, respectivamente, median la fosforilación de Cdc25A necesaria para su marcaje con ubiquitina y consecuente degradación (Falck, Mailand, Syljuasen, Bartek, & Lukas, 2001; Mailand et al., 2000). Cdc25A se encarga de eliminar la fosforilación inhibitoria en las tirosina 15 y treonina 14 de Cdk2 (Bartek & Lukas, 2001), quinasa encargada de promover la entrada en S. La falta de actividad de Cdc25A hace que Cdk2

permanezca fosforilada y el complejo ciclina E/Cdk2 quede inactivado. Esto bloquea a la célula en la transición G1/S, ya que se evita, entre otros procesos, la estimulación de la unión de Cdc45 a los complejos de pre-replicación y el reclutamiento de las polimerasas (Costanzo et al., 2000).

### *3.1.2 Mecanismo dependiente de p53*

La parada del ciclo celular por esta vía es más lenta, puesto que requiere la estabilización y activación de p53 para que se una al ADN y a su vez active la transcripción de genes como p21, que inhibe los complejos ciclina E/Cdk2, esenciales en esta parada (Sherr & Roberts, 1999). Se trata de un mecanismo fundamental para mantener el arresto del ciclo celular más allá de la degradación transitoria de Cdc25A y mientras sea necesario (Ryan et al., 2001; Vogelstein, Lane, & Levine, 2000). En condiciones normales, p53 es una proteína bastante inestable y su estabilización se consigue por distintos mecanismos. Por un lado, Chk2/Chk1 fosforila a p53 en su serina 20, evitando su interacción con Mdm2 (Chehab, Malikzay, Appel, & Halazonetis, 2000; Shieh, Ahn, Tamai, Taya, & Prives, 2000), que es la ubiquitin ligasa que promueve su degradación. Por otro, ATM (y probablemente ATR) puede fosforilar directamente a Mdm2 en su serina 395, lo que provoca su exportación al citoplasma (Y. Zhang & Xiong, 2001) y evitando así la degradación de p53, y a p53 en la serina 15, induciendo su activación (Kastan & Lim, 2000; Ryan et al., 2001; Shiloh, 2001).

### *3.2 El checkpoint de fase S*

Durante esta fase, la célula es más vulnerable a sufrir daño asociado al proceso de replicación. Algunas lesiones en el ADN solamente son detectadas cuando interfieren con la maquinaria de replicación y, como se ha mencionado anteriormente, esto puede causar el bloqueo de la horquilla y la generación de roturas de cadena sencilla o de la doble hebra e, incluso, el desmantelamiento del replisoma. Por eso, uno de los papeles fundamentales de este *checkpoint* es evitar que todo esto ocurra, parando el ciclo, estabilizando la horquilla de replicación (Lopes et al., 2001; Tercero

& Diffley, 2001) y regulando procesos como la transcripción de genes implicados en la respuesta a daño (Allen, Zhou, Siede, Friedberg, & Elledge, 1994), la activación de orígenes de replicación (Santocanale & Diffley, 1998; Santocanale, Sharma, & Diffley, 1999; Shirahige et al., 1998), la reparación del daño, (Kai, Furuya, Paderi, Carr, & Wang, 2007), y la reanudación del avance de las horquillas bloqueadas cuando el daño ha sido reparado (Desany, Alcasabas, Bachant, & Elledge, 1998; Szyjka et al., 2008).

Como se describe en un apartado anterior, ATR puede intervenir en la parada del ciclo en respuesta a problemas durante la replicación, y también actúa estabilizando las horquillas bloqueadas mediante fosforilación de alguno de sus componentes (Katou et al., 2003).

También la implicación de ATM en el *checkpoint* de fase S ha sido documentada en trabajos que demuestran que la interferencia en esta vía conlleva al fenómeno de síntesis de ADN resistente a la radiación (Falck et al., 2001), originalmente descrito en pacientes de ataxia telangiectasia (Kastan & Lim, 2000; Shiloh, 2001).

La formación de roturas en la doble hebra del ADN activa la parada del ciclo por la vía ATM-Chk2 durante la replicación mediante dos mecanismos:

### *3.2.1 Mecanismo dependiente de Cdc25A*

Se ha descrito un mecanismo de parada en fase S donde ATM fosforila a Chk2 y ésta a Cdc25A, lo que provoca la inactivación de los complejos ciclina A/Cdk2 (Costanzo et al., 2000; Mailand et al., 2000) y el consecuente bloqueo del ciclo.

### *3.2.2 Mecanismo independiente de Cdc25A*

ATM, además, interviene en la parada del ciclo por un mecanismo que implica la fosforilación de BRCA1 (Cortez, Wang, Qin, & Elledge, 1999; S. Li et al., 2000) y Nbs1 (Gatei et al., 2000; Lim et al., 2000; X. Wu et al., 2000; S. Zhao et al., 2000), componentes de la vía ATM-Chk2.

### 3.3 El checkpoint G2/M

Este punto de control evita la progresión a mitosis de células cuyo material genético presenta algún problema y, por tanto, no está listo para ser segregado a las células hijas. También en este caso, similar al *checkpoint G1/S*, la parada del ciclo celular se efectúa mediante dos vías: una de activación temprana e inmediata, independiente de p53, y otra posterior y más duradera, dependiente de p53. En ambos casos se consigue la inactivación de Cdc25, evitando la activación de los complejos ciclina B/Cdk1 y la entrada en mitosis.

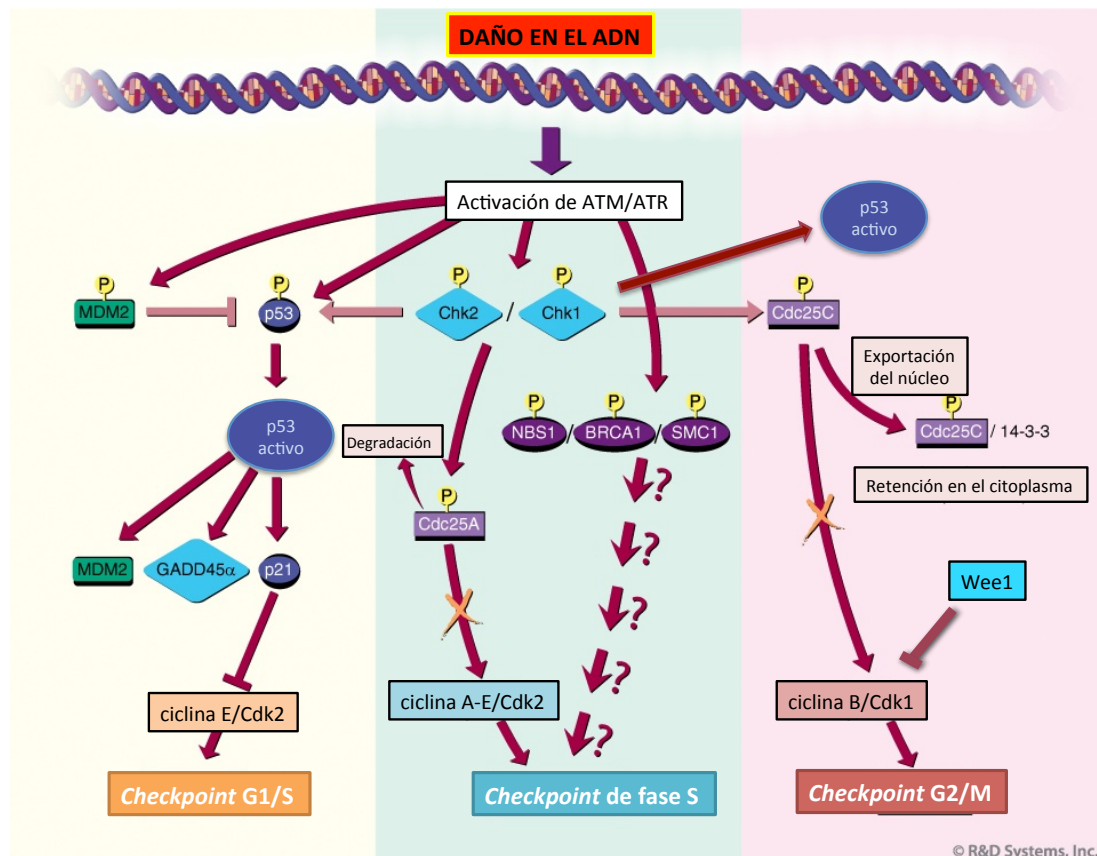
#### 3.3.1 Mecanismo independiente de p53

Para conseguir la inmediata inactivación de Cdk1, las vías de ATM-Chk2 y ATR-Chk1 fosforilan a la fosfatasa Cdc25A, promoviendo su degradación vía proteosoma dependiente del complejo ubiquitin ligasa SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> (Jin et al., 2003), y a Cdc25C, favoreciendo su unión a proteínas 14-3-3 y su exportación al citoplasma (Sanchez et al., 1997). Además, Chk1 fosforila a Wee1 promoviendo su activación por unión a proteínas 14-3-3 (Coleman & Dunphy, 1994) (ver apartado *Wee1*). Todos estos procesos contribuyen a mantener la fosforilación inhibitoria de Cdk1 e impedir la entrada en mitosis.

#### 3.3.2 Mecanismo dependiente de p53

Si la lesión persiste, tiene lugar la activación de un mecanismo de actuación más lenta y acción duradera, que implica la estabilización y activación de p53 (W. R. Taylor & Stark, 2001). Una vez activo, p53 promueve la transcripción de 3 genes implicados en la inactivación de Cdk1: p21, inhibidor de Cdks; 14-3-3, que se une a Cdc25C e induce su exportación al citoplasma; y Gadd45, que provoca la disociación los complejos Cdk1/ciclina B al unirse a ellos (Zhan et al., 1999).





**Figura I 7:** Esquema de los diferentes *checkpoints* del ciclo celular.

### 3.4 Recuperación del *checkpoint* G2/M

La reanudación del ciclo celular una vez el daño en el ADN ha sido reparado, requiere la degradación, mediada por proteosoma y dependiente de fosforilación, de dos proteínas fundamentales en la activación de este *checkpoint*: Claspin y Wee1. Por un lado, la destrucción de Claspin afecta directamente a la actividad de Chk1, cuya inactivación permite la acumulación y activación de Cdc25 (fosfatasa activadora de Cdk) y, por otro, la degradación de Wee1 elimina a un inhibidor directo de Cdk1. Estos dos mecanismos conducen a la activación de los complejos ciclina B/Cdk1 y a la entrada en mitosis.

La eliminación de Claspin y Wee1 es mediada por el complejo SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> (Mailand, Bekker-Jensen, Bartek, & Lukas, 2006; Mamely et al., 2006; Watanabe et al., 2004) el cual, curiosamente, también es capaz de promover la degradación de la fosfatasa activadora de Cdk, Cdc25

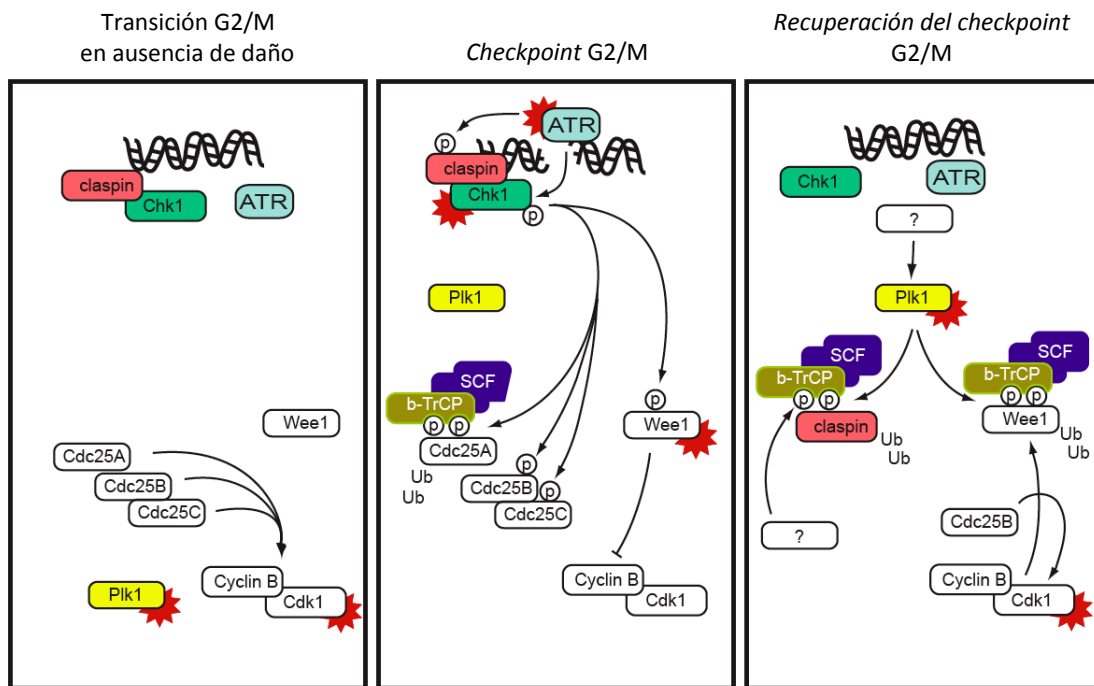
(Kanemori, Uto, & Sagata, 2005; Myers & Cortez, 2006), induciendo un rápido bloqueo en diferentes puntos del ciclo, incluido el *checkpoint* G2/M. La explicación de cómo esta misma enzima puede controlar los procesos opuestos de activación del *checkpoint* y reanudación del ciclo radica en el reconocimiento de sustratos de  $\beta$ -TrCP, estrictamente dependiente de fosforilación (Cardozo & Pagano, 2004). En la activación del *checkpoint*, Chk1 fosforila a Cdc25 generando la marca que será reconocida por  $\beta$ -TrCP. Por el contrario, en la recuperación tras este arresto, la encargada de marcar a Claspin (Mailand et al., 2006; Peschiaroli et al., 2006) y Wee1 para su eliminación es Plk1 (van Vugt, Bras, & Medema, 2004), que a su vez es activada por Aurora A (Macůrek et al., 2008).

La degradación de Wee1 ha sido descrita en *Saccharomyces cerevisiae* (McMillan, Theesfeld, Harrison, Bardes, & Lew, 2002), en extractos de huevo de *Xenopus laevis* (Michael & Newport, 1998) y en células somáticas humanas (Watanabe, Broome, & Hunter, 1995).

En *Xenopus* es necesario que se complete la replicación del ADN para que ocurra la degradación de Wee1, lo que concuerda con el papel de esta proteína en el *checkpoint* G2/M. Tanto en el contexto de una transición G2/M normal como en la reanudación del ciclo tras el *checkpoint*, la degradación de Wee1 es llevada a cabo vía proteosoma y requiere de su previa fosforilación (Michael & Newport, 1998). Como hemos mencionado anteriormente, el marcaje de Wee1 con ubiquitina lo realiza el complejo ubiquitin ligasa SCF que contiene la proteína F-box  $\beta$ -TrCP, aunque se cree que Tome-1 puede tener un papel adicional en este proceso (Ayad et al., 2003; Watanabe et al., 2004).

A pesar de carecer del motivo conservado DS(p)GXXS(p) (llamado fosfo-degrón) de unión a  $\beta$ -TrCP, Wee1 es reconocido por esta E3 ubiquitin-ligasa gracias a la fosforilación de sus serinas 53 y 123 por las quinasas Plk1 y Cdk1, respectivamente (Watanabe et al., 2005).

Existen estudios que sostienen que Plk1 no es imprescindible para la regulación de la entrada en mitosis en condiciones normales, mientras que sí lo es para la reanudación del ciclo tras el arresto causado en condiciones de daño (van Vugt et al., 2004).



**Figura I 8:** Transición, *checkpoint* y recuperación del *checkpoint* G2/M (adaptado de Freire, van Vugt, Mamely, & Medema, 2006)

#### 4. Wee1

Wee1 es una serina/tirosina/treonina-quinasa de unos 107 kDa en *Schizosaccharomyces pombe* (Featherstone & Russell, 1991) y 95 kDa en humanos (Parker, Sylvestre, Byrnes, Liu, & Piwnica-Worms, 1995), implicada en el control de la entrada en mitosis en un ciclo celular normal y en la activación del *checkpoint* G2/M en condiciones de daño en el ADN.

La identificación de esta proteína como reguladora del ciclo celular tuvo lugar en los años 70, a partir de estudios que consistían en el aislamiento de mutantes termosensibles de *Schizosaccharomyces pombe* que presentaban defectos en control de la división y el crecimiento celular. Estos mutantes fueron llamados *wee*, del escocés *pequeño*, debido a que, a pesar de tener una proliferación similar a las células silvestres, iniciaban la división con un tamaño menor. Posteriormente, se observó que los mutantes *wee* poseían una fase G1 más larga y una fase G2 más corta que las cepas silvestres; además, cuando estos mutantes termosensibles se pasaban de baja a alta temperatura, el primer evento del ciclo que tenía lugar era la mitosis, resultados que, en su conjunto, apuntaban hacia un defecto en el

control de la entrada en dicha fase (Nurse, 1975; Nurse & Thuriaux, 1980; Russell & Nurse, 1987; Thuriaux, Nurse, & Carter, 1978).

Trabajos en *S. pombe* permitieron describir la estructura de esta proteína, distinguiendo un dominio catalítico de unos 350 aminoácidos en su extremo C-terminal y un dominio N-terminal de unos 550 aminoácidos, que contiene las secuencias necesarias para su regulación negativa (NRD, del inglés *amino-terminal regulatory domain*), mediante la fosforilación por Cdk1 en las treoninas 104 y 105 en Wee1 de *Xenopus laevis* y la tirosina 239 en células somáticas humanas (Aligue, Wu, & Russell, 1997; Harvey, Charlet, Haas, Gygi, & Kellogg, 2005; S. Y. Kim & Ferrell, 2007; S. Y. Kim, Song, Lee, & Ferrell, 2005). Además, en la región central de la proteína, entre los residuos 363 y 408, se identificaron secuencias importantes para su actividad que, se cree, están relacionadas con el reconocimiento de sustratos (Aligue et al., 1997).

Estudios realizados tanto en *S. pombe* como en *Xenopus* y células humanas, concluyen que la transición G2/M es inducida principalmente por la actividad de la quinasa Cdk1 acompañada con la ciclina B (ver apartado *Fases G2 y M*) (Nurse, 1990). En *S. pombe* Cdk1 es regulado negativamente por fosforilación en su tirosina 15 (Gould & Nurse, 1989) por Wee1 y Mik1 (Lundgren et al., 1991; Russell & Nurse, 1987), mientras que en eucariotas superiores, incluyendo células de mamífero, se requiere además la fosforilación de la treonina 14 (Krek & Nigg, 1991; Norbury, Blow, & Nurse, 1991). En humanos Wee1 fosforila constitutivamente a Cdk1 y Cdk2 en la tirosina 15 (Parker & Piwnicka-Worms, 1992) y Myt1 fosforila a Cdk1 en la treonina 14 (Booher et al., 1997). Wee1 se encarga de mantener al complejo ciclina B/Cdk1 inactivo durante las fases S y G2 (Watanabe et al., 1995).

Como se ha comentado, la actividad de Wee1 es contrarrestada por la fosfatasa Cdc25, que elimina la fosforilación inhibitoria en Cdks y, por consiguiente, promueve la transición G2/M (Gautier, Solomon, Booher, Bazan, & Kirschner, 1991). Ya que el control de la entrada en mitosis es de vital importancia para la célula, las actividades de la quinasa Wee1 y la fosfatasa Cdc25 están estrictamente reguladas a distintos niveles durante el ciclo; ésta última, además, posee diferentes mecanismos de regulación

dependiendo de la isoforma de la que se trate y del punto del ciclo en el que se encuentre (Izumi, Walker, & Maller, 1992; Kumagai & Dunphy, 1992), como hemos mencionado en apartados anteriores.

En términos generales, la fosforilación de Cdc25 por Chk1/Chk2 puede inducir su degradación, mientras que distintas Cdks pueden tanto estimular su actividad, como inducir o prevenir su degradación por proteosoma. Además, la actividad de Cdc25 está controlada por su localización subcelular, ya sea mediante fosforilación por Plk1 (Elia, Cantley, & Yaffe, 2003; Kumagai & Dunphy, 1996), que promueve su traslocación al núcleo, o por Chk1 y Chk2 (Matsuoka, Huang, & Elledge, 1998; Sanchez et al., 1997) que permite su unión a proteínas 14-3-3 y exportación al citoplasma (Dalal, Schweitzer, Gan, & DeCaprio, 1999; Donzelli & Draetta, 2003; Kumagai & Dunphy, 1999).

Wee1 también está sometida a una estricta regulación durante el ciclo, tanto positivamente, mediante fosforilación directa por Chk1 (O'Connell, Raleigh, Verkade, & Nurse, 1997) y consecuente unión a proteínas 14-3-3 a través de su extremo C-terminal (J. Lee, Kumagai, & Dunphy, 2001; Y. Wang et al., 2000), como negativamente, a través de su degradación dependiente de fosforilación en su extremo N-terminal por las quinasas Cdk1 (Atherton-Fessler et al., 1994; Harvey et al., 2005; McGowan & Russell, 1995) y Plk1 (Watanabe et al., 2004; Atherton-Fessler et al., 1994; Harvey et al., 2005; McGowan & Russell, 1995). Esta degradación es, precisamente, uno de los mecanismos más importantes que hacen que el equilibrio entre las actividades opuestas de Wee1 y Cdc25 se incline, al final de una fase G2 normal, hacia la entrada irreversible en mitosis (Pomerening, Kim, & Ferrell, 2005; Pomerening, Sontag, & Ferrell, 2003).

#### *4.1 Wee1 y Cdk2*

Cdk2 ha sido implicada en múltiples puntos del ciclo celular incluyendo la transición G1/S, la iniciación y mantenimiento de la replicación en fase S y la fase G2 (Hu, Mitra, van den Heuvel, & Enders, 2001). Además, a pesar de que el modelo actual defiende al complejo ciclina B/Cdk1 como principal promotor de la transición G2/M, existen estudios que sugieren la

implicación de ciclina A/Cdk2 en la entrada y progresión de las células a través de la fase de mitosis (Furuno, Elzen, & Pines, 1999).

Aunque Wee1 se ha descrito como el controlador fundamental de Cdk1, existen conexiones entre Wee1 y Cdk2. De hecho, en algunos trabajos se ha sugerido un posible papel regulador de los complejos ciclina A/Cdk2 sobre Wee1 en células humanas. Así, se ha descrito la fosforilación en la treonina 239 de Wee1 por ciclina A/Cdk2, lo que requiere la interacción directa entre ambos a través del motivo RXL en el extremo N-terminal de Wee1, que conduce a su exportación al citoplasma (y por tanto bloquea la función de Wee1 como inhibidor de Cdk). Este evento, aunque no parece ser esencial para la entrada en mitosis, puede tener un papel funcional en esta transición (C. Li, Andrade, Dunbrack, & Enders, 2010).

Otros trabajos relacionan a Wee1 con los complejos ciclina E/Cdk2 en el desarrollo embrionario de *Xenopus laevis*, concretamente en el remodelado intensivo que tiene lugar en el comienzo de la transición de la blástula media. La coordinación de este proceso está regulada por los complejos ciclina E/Cdk2 y la degradación de Wee1. Estos estudios demuestran que Wee1 interfiere en el desarrollo embrionario de *Xenopus*, induciendo la muerte celular por apoptosis al alterar la actividad de Cdk2 (Wroble, Finkielstein, & Sible, 2007).

Además, existen trabajos que describen la regulación negativa de la actividad de Cdk2 mediante fosforilación por Wee1 en células humanas (Watanabe et al., 1995; C. L. Wu et al., 2001), estudios que, en su conjunto, sugieren la intervención de Wee1 en otros puntos del ciclo celular, además de la transición G2/M.

### ***5. Reparación del daño en el ADN***

Además de la activación de los *checkpoints* descritos en respuesta a daño en el ADN, existen mecanismos capaces de detectar y corregir errores puntuales en el ADN, ya sean causados por incorporación de bases incorrectas durante la síntesis del ADN, por inserciones o deleciones, o por modificaciones químicas de los nucleótidos. Algunos de los procesos mejor

descritos para la reparación de distintos tipos de daño son los mecanismos BER (del inglés *base excision repair*), NER (del inglés *nucleotide excision repair*), o MMS (del inglés *mismatch repair*), pero, además, la célula es capaz de solucionar problemas de roturas de la doble hebra del ADN mediante los mecanismos NHEJ (del inglés *non-homologous end joining*) o HR (del inglés *homologous recombination*).

### 5.1 BER: Reparación por escisión de bases

Se trata de un mecanismo que corrige el daño producido en una base por procesos de oxidación, metilación, deaminación o por pérdida espontánea de la base (Memisoglu & Samson, 2000). En líneas generales, consiste en la eliminación de la base dañada mediante la ruptura del enlace N-glicosídico entre ésta y el esqueleto pentosa-fosfato, dejando un sitio apurínico que será procesado por la enzima AP endonucleasa 1 (APE1). Posteriormente, la ADN polimerasa  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) añade un nucleótido en esta posición y, por último, la ADN ligasa, sella la unión. En ocasiones puede tener lugar la eliminación de uno o dos nucleótidos, además de la base dañada (Matsumoto, Kim, & Bogenhagen, 1994).

### 5.2 NER: Reparación por escisión de nucleótidos

El mecanismo NER actúa sobre lesiones que causan, simultáneamente, un cambio químico y una distorsión de la doble hélice del ADN (Hess, Schwitter, Petretta, Giese, & Naegeli, 1997). Se trata de lesiones muy diversas, destacando los dímeros de pirimidina tipo ciclobutano y los fotoproductos 6-4, causados ambos por la radiación UV. También actúa sobre cambios estructurales causados por agentes químicos unidos covalentemente a las bases del ADN (Poirier, 2004), los cuales pueden causar la distorsión de la doble hélice y la incorporación de bases erróneas durante la replicación, o también sobre entrecruzamientos (X. Wang et al., 2001) y algunas lesiones debidas a daño oxidativo (Pascucci, D'Errico, Parlanti, Giovannini, & Dogliotti, 2011).

En este mecanismo intervienen diversidad de proteínas encargadas en reconocer el daño, abrir el ADN de la zona, realizar incisiones, reemplazar el nucleótido dañado y sellar las uniones (Batty & Wood, 2000). Así, tras el reconocimiento del daño, la proteína RPA se une a la zona afectada; seguidamente, la helicasa XPD desenrolla el ADN de los alrededores de la lesión y las endonucleasas XPG y ERCC1/XPF cortan una de las hebras a ambos lados de ésta. De este modo, se elimina un oligonucleótido de unos 30 pb, dejando paso a la síntesis de nuevo ADN por la ADN polimerasa  $\epsilon$ . Finalmente, la ADN ligasa actúa sellando las mellas.

### *5.3 MMR: Reparación de apareamientos erróneos*

Es el mecanismo encargado de solucionar problemas de apareamientos erróneos, pero también deleciones o inserciones causados por errores de la polimerasa. El proceso es, en esencia, similar al de los mecanismos BER y NER, incluyendo el reconocimiento de la lesión, corte, eliminación, síntesis y ligación (Marti, Kunz, & Fleck, 2002).

En mamíferos, la lesión es reconocida por el heterodímero MSH2-MSH6 que permitirá el reclutamiento de otras proteínas como MLH1-PMS2, MLH1-MLH3 y factores de replicación. En la escisión y resíntesis intervienen diversas proteínas como PCNA, RPA, RFC, la exonucleasa I, las ADN polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$ , y la endonucleasa FEN1 (Buermeyer, Deschenes, Baker, & Liskay, 1999).

### *5.4 NHEJ: Unión de extremos no-homólogos*

Se trata de un mecanismo de reparación de roturas de la doble hebra que puede conllevar errores y por tanto es el preferido en la fase G1 del ciclo celular, cuando el DNA todavía no se ha replicado y no se puede disponer de una cromátida hermana para la reparación por recombinación homóloga. Una proteína esencial en este mecanismo es el heterodímero Ku70/Ku80 (Featherstone & Jackson, 1999) que inicia el proceso al unirse a los extremos dañados, interviniendo también en el reclutamiento de otros



factores como DNA-PK, XRCC4 y la ADN ligasa IV (S. P. Jackson, 2002; Lieber, Gu, Lu, Shimazaki, & Tsai, 2010).

Cuando DNA-PK se activa al unirse al ADN, promueve la fosforilación de sustratos como Ku y XRCC4, cofactor de la ADN ligasa IV. Para poder ser religados, los extremos dañados han de ser procesados, evento en el que intervienen diversas proteínas como el complejo MRE11/Rad50/NBS1 (Haber, 1998; Petrini, 2000), FEN-1 (X. Wu, Wilson, & Lieber, 1999) y la proteína Artemis (Franco et al., 2008; Moshous et al., 2001). El paso final de ligación lo lleva a cabo la ADN ligasa IV y su cofactor XRCC4.

### *5.5 HR: Recombinación homóloga*

Durante las fases S y G2, cuando la célula ya posee parcial o totalmente duplicado su material genético, una cadena de ADN no dañada puede servir de molde para reparar roturas de la doble hebra de una manera fidedigna.

Se trata de un proceso complejo para el que se han propuesto diversos modelos que tratan de explicar los mecanismos que operan bajo distintas circunstancias biológicas y en distintos organismos (Krejci, Altmannova, Spirek, & Zhao, 2012), y se ha propuesto la intervención de diversas proteínas como RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, Mre11 (Sonoda, Takata, Yamashita, Morrison, & Takeda, 2001), BRCA1 o BRCA2 (S. P. Jackson, 2002; Powell & Kachnic, 2003).

En líneas generales, el primer paso consiste en la unión del complejo MRN a los extremos generados. Posteriormente, estos extremos bicatenarios han de ser procesados mediante resección del ADN, evento en el que intervienen Mre11, la exonucleasa Exo1 (Bolderson et al., 2010; Garcia, Phelps, Gray, & Neale, 2011) y CtIP (Sartori et al., 2007), y que genera un extremo 3' protuberante y una región monocatenaria necesaria para el reclutamiento de RPA y Rad51. Rad51 unido al ADN forma un nucleofilamento que, una vez localiza la secuencia de ADN en la cromátida homóloga que va a ser utilizada como molde, invade la doble hélice no dañada en un proceso conocido como intercambio genético. Mediante la acción de una ADN polimerasa se extiende el extremo 3' de la hebra

invasora y una ADN ligasa cierra la unión. El paso final de la recombinación consiste en la separación de las dos hebras de ADN mediante la acción de distintos complejos que resuelven este entrecruzamiento. Estas proteínas se llaman resolvasas y entre ellas se encuentra la endonucleasa Mus81-Eme1.

#### *5.5.1 Mus81-Eme1: Endonucleasa implicada en la reparación por recombinación homóloga*

Además de las proteínas descritas en el apartado anterior, la endonucleasa Mus81-Eme1 también está implicada en procesos de reparación. Se trata de una proteína heterodimérica en la que la actividad catalítica se localiza en la subunidad Mus81 y Eme1 posee una función reguladora.

El gen Mus81 fue identificado por primera vez en un rastreo de doble híbrido empleando como cebo a la proteína de reparación Rad54 de *Saccharomyces cerevisiae*. Mus81 consta de 632 aminoácidos y tiene 72 kD de peso molecular. Posee dos motivos hélice-horquilla-hélice, comunes a muchas proteínas involucradas en el metabolismo del ADN en bacterias, levaduras y mamíferos. Los mutantes para esta proteína muestran una elevada sensibilidad frente a estrés genotóxico asociado a la replicación, como se ha podido ver mediante el tratamiento con radiación UV o metilsulfonato, y son incapaces de completar la meiosis (Interthal & Heyer, 2000). Estudios sobre su actividad enzimática, la sensibilidad a daño de los mutantes, y el hecho de que éstos presentaban fenotipos similares a los mutantes para genes de resolvasas de *Holliday junctions*, ayudaron a situar a Mus81-Eme1 como implicada en la resolución de este tipo de estructuras (Boddy et al., 2001).

En células somáticas, las *Holliday junctions* pueden formarse entre cromátidas hermanas como resultado del procesamiento de roturas del ADN por recombinación homóloga, o tras el bloqueo de horquillas de replicación. Su eliminación se consigue por distintos mecanismos y en ellos intervienen diversas enzimas. Por un lado, en la resolución de estructuras dobles de *Holliday junction*, interviene el complejo BTR, formado por la helicasa BLM, la topoisomerasa III, RMI1 y RMI2

(Mankouri & Hickson, 2007; L. Wu & Hickson, 2003). En este complejo, BLM estimula a la topoisomerasa III para relajar el superenrollamiento negativo del ADN, mientras que RMI1 y RMI2 parecen estar implicados en la localización de BLM en los sitios de daño en el ADN (Payne & Hickson, 2009).

Por otro lado, otras proteínas implicadas en la resolución de estas estructuras son la endonucleasas Mus81-Eme1 (X. B. Chen et al., 2001; Ciccía, Constantinou, & West, 2003; Ciccía, McDonald, & West, 2008; E. R. Taylor & McGowan, 2008), SLX1-SLX4 (Andersen et al., 2009; Fekairi et al., 2009; Muñoz et al., 2009; Svendsen et al., 2009) y Gen1 (Ip et al., 2008; Rass et al., 2010).

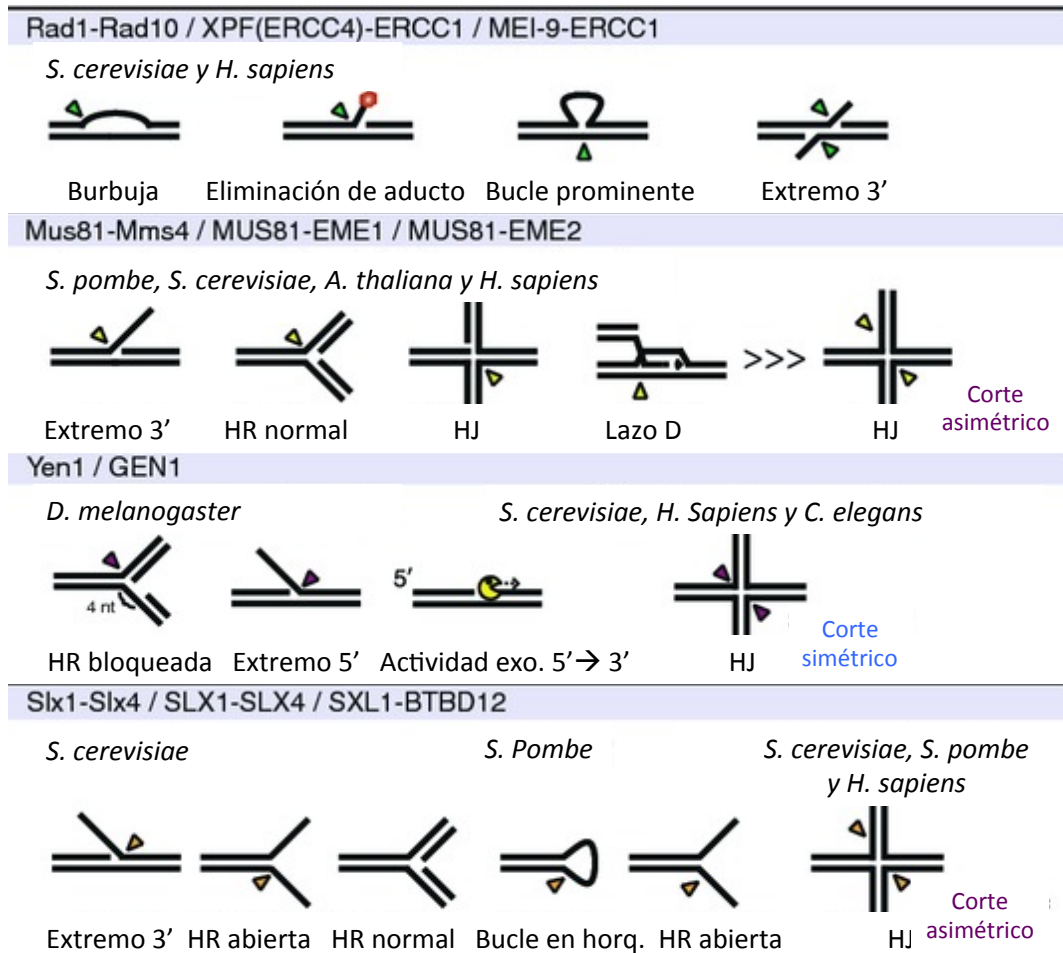
Células carentes de BLM o procedentes de pacientes con síndrome de Bloom, asociado a una mutación en esta proteína, presentan un elevado índice de intercambio entre cromátidas, y estos enfermos tienen una alta predisposición a sufrir distintos tipos de cáncer. La ausencia de actividad de BLM, Mus81 y Gen1 conduce a aberraciones cromosómicas severas, lo que indica la importancia del procesamiento de estas estructuras en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Wechsler, Newman, & West, 2011).

Experimentos en levaduras han demostrado que la actividad de Mus81-Eme1 (Mus81-Mms4 en *S. cerevisiae*) está regulada en el ciclo mediante fosforilación por la quinasa-tipo-Polo, Cdc5, que causa su activación en meiosis I para el entrecruzamiento cromosómico en el proceso de segregación, mientras que Yen1 (ortólogo en levaduras de Gen1 en mamíferos) es activada en meiosis II para resolver las *Holliday junctions* que puedan persistir.

En humanos, un mecanismo similar restringe la actividad de Mus81-Eme1 hasta la mitosis, donde parece ser activada, en este caso por Plk1 (ortólogo de Cdc5 en humanos), para facilitar la segregación de los cromosomas (Matos, Blanco, Maslen, Skehel, & West, 2011).

Mus81, además, ha sido relacionada con la quinasa del *checkpoint* de *S. pombe*, Cds1, implicada en el *checkpoint* S/M y en la supervivencia al

estrés replicativo, mediante la estabilización de horquillas de replicación bloqueadas.



**Figura I 9:** Distintas endonucleasas eucarióticas y su especificidad de sustrato. Se muestran los sitios de corte identificados para ERCC4-ERCC1 (*triángulos verdes*), MUS81-EME1 (*triángulos amarillos*), GEN1 (*triángulos púrpura*), y SLX1-SLX4 (*triángulos naranjas*). HR: horquilla de replicación; HJ: *Holliday junction* (adaptado de Schwartz & Heyer, 2011)

## II. OBJETIVOS

El mantenimiento de la estabilidad genómica es crucial para garantizar la supervivencia de la célula y evitar la transmisión a células hijas de lesiones en el ADN que pudieran desencadenar patologías como el cáncer. Las dos principales vías que constituyen la respuesta de la célula al daño en su ADN son la vía de ATR y la de ATM, y un marcador común a la activación de ambas, que es la fosforilación de la histona H2AX. Por ello, hemos tomado este evento como lectura en un rastreo diseñado con el fin de identificar nuevas quinasas implicadas en el mantenimiento de la estabilidad genómica. De este modo, empleando una librería de ARN interferente contra unas 800 quinasas del quinoma humano, tratamos de identificar cuáles de estas moléculas están relacionadas con la inestabilidad genómica mediante la medición, por inmunofluorescencia, de la fosforilación de la histona H2AX.

Los objetivos fundamentales de este trabajo han sido los siguientes:

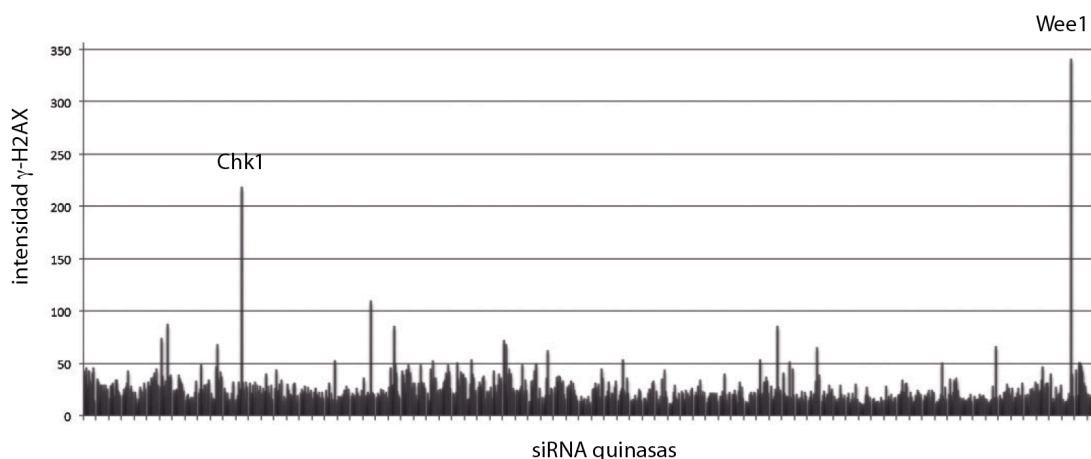
1. Identificar nuevas quinasas implicadas en el mantenimiento de la estabilidad genómica.
2. Una vez identificada la quinasa, caracterizar el tipo de daño que se genera en su ausencia.
3. Estudiar la implicación de esta quinasa en otras funciones de la célula, como, por ejemplo, la progresión durante el ciclo celular.
4. Tratar de estudiar el mecanismo mediante el cual esta quinasa ejerce su función en el marco de la estabilidad genómica, teniendo en cuenta los conocimientos previos sobre ella.
5. Tratar de encontrar la diana sobre la que actúa dicha quinasa y describir el tipo de regulación que existe entre diana y quinasa.

### III. RESULTADOS

#### *1. La ausencia de Wee1 causa la activación de la respuesta a daño en el ADN*

Existen dos vías fundamentales en la respuesta a daño en el ADN de la célula: la vía de ATR-Chk1 y ATM-Chk2. Un marcador común a la activación de ambas es la fosforilación de la histona H2AX ( $\gamma$ -H2AX). Por ello, tomamos este evento para identificar nuevos genes implicados en la regulación de la estabilidad genómica dentro de las quinasas humanas, mediante el uso de un rastreo con oligonucleótidos de ARN interferente (siRNA).

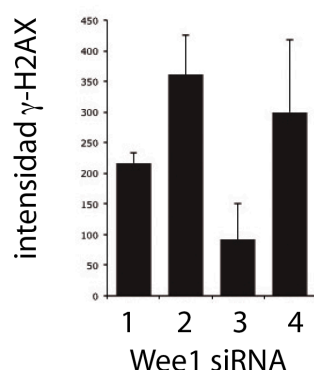
Así, eliminamos de la célula cada una de las quinasas del quinoma humano (cerca de 800) mediante el tratamiento con una mezcla de cuatro siRNA dirigidos para inhibir la expresión de cada una de ellas. Seguidamente, estudiamos por inmunofluorescencia y con un anticuerpo específico contra la histona H2AX fosforilada ( $\gamma$ -H2AX), cuál de estos tratamientos causaba un aumento en sus niveles. El rastreo produjo dos resultados muy claros: la ausencia individual de las proteín-quinasas Wee1 y Chk1 causaba en la célula un incremento considerable de  $\gamma$ -H2AX (Figura 1).



**Figura 1: Identificación de Wee1 como regulador de la estabilidad genómica.** Células U2OS fueron transfectadas con una mezcla de siRNAs contra cada una de las 790 quinasas del quinoma humano. 48 horas más tarde, las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpos anti- $\gamma$ -H2AX y analizadas como se describe en Materiales y Métodos. Se indican las quinasas con valores de intensidad de  $\gamma$ -H2AX por célula significativamente superiores al resto de los tratamientos.

El papel de Chk1 en la respuesta a daño en el ADN ha sido descrito con anterioridad y se encuentra bastante bien caracterizado (Syljuasen et al., 2005). Wee1 es un importante regulador del ciclo celular, descrito junto a Myt1 (Fattaey & Booher, 1997; Mueller, Coleman, Kumagai, & Dunphy, 1995) como responsable de la fosforilación inhibitoria de Cdk1 en la tirosina 15, evitando así la entrada de la célula en la fase de mitosis. No obstante, el papel de esta quinasa en el mantenimiento de la estabilidad genómica era prácticamente desconocido cuando iniciamos este trabajo, por lo que decidimos centrar nuestro estudio en ella.

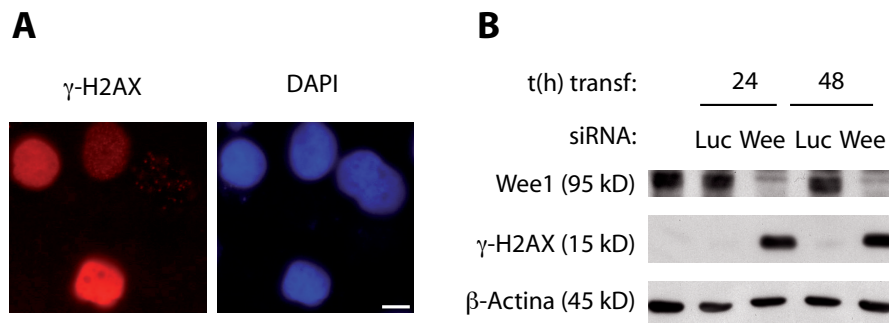
Ya que el rastreo se realizó con una mezcla de cuatro oligonucleótidos para cada quinasa, lo primero que hicimos fue confirmar estos resultados preliminares mediante la transfección de con cada uno de los siRNA por separado. Pudimos demostrar que el tratamiento con tres de los cuatro oligonucleótidos individuales resultaba en un aumento de  $\gamma$ -H2AX, indicando que el fenotipo observado por inhibición de Wee1 no es el resultado de un efecto indirecto.



**Figura 2: Eficacia de la eliminación de Wee1 con los cuatro siRNA de la mezcla.** Los cuatro siRNA utilizados para inhibir la expresión de Wee1 en la figura 1 fueron transfectados separadamente y analizados como antes. Se muestra la intensidad de fluorescencia media de tres experimentos, con las barras de error representando el error estándar de la media.

La fosforilación de la histona medida por inmunofluorescencia puede dar varios patrones de marcaje distintos. Por ejemplo, puede formar focos nucleares bien definidos en presencia de radiación ionizante, por lo que se

creo que colocaliza con roturas de la doble hebra del ADN. Otro patrón de tinción de  $\gamma$ -H2AX es el de una distribución homogénea en el núcleo, típica del daño en el ADN ocurrido generalmente en fase S como resultado del procesamiento o incluso colapso de las horquillas de replicación bloqueadas (Marti, Hefner, Feeney, Natale, & Cleaver, 2006). En nuestro estudio, al observar estas células por microscopía, pudimos detectar que el anticuerpo anti- $\gamma$ -H2AX marcaba el núcleo homogéneamente (Figura 3A) de forma similar a lo observado en células que presentan daño durante fase S, y el incremento en la señal aparecía apenas 24 horas después de la transfección con el ARN interferente, tiempo en el cual los niveles de Wee1 ya se mostraban notablemente reducidos (Figura 3B).



**Figura 3: La eliminación de Wee1 induce la fosforilación de H2AX.** (A) Marcaje típico de  $\gamma$ -H2AX tras la transfección con el siRNA número 2 contra Wee1 en células U2OS. Barras, 10  $\mu$ m. (B) Se transfectaron células U2OS con siRNA control (contra Luciferasa) o contra Wee1 por los tiempos indicados. Luego, las células fueron lisadas y analizadas por *Western blot* empleando los anticuerpos señalados.

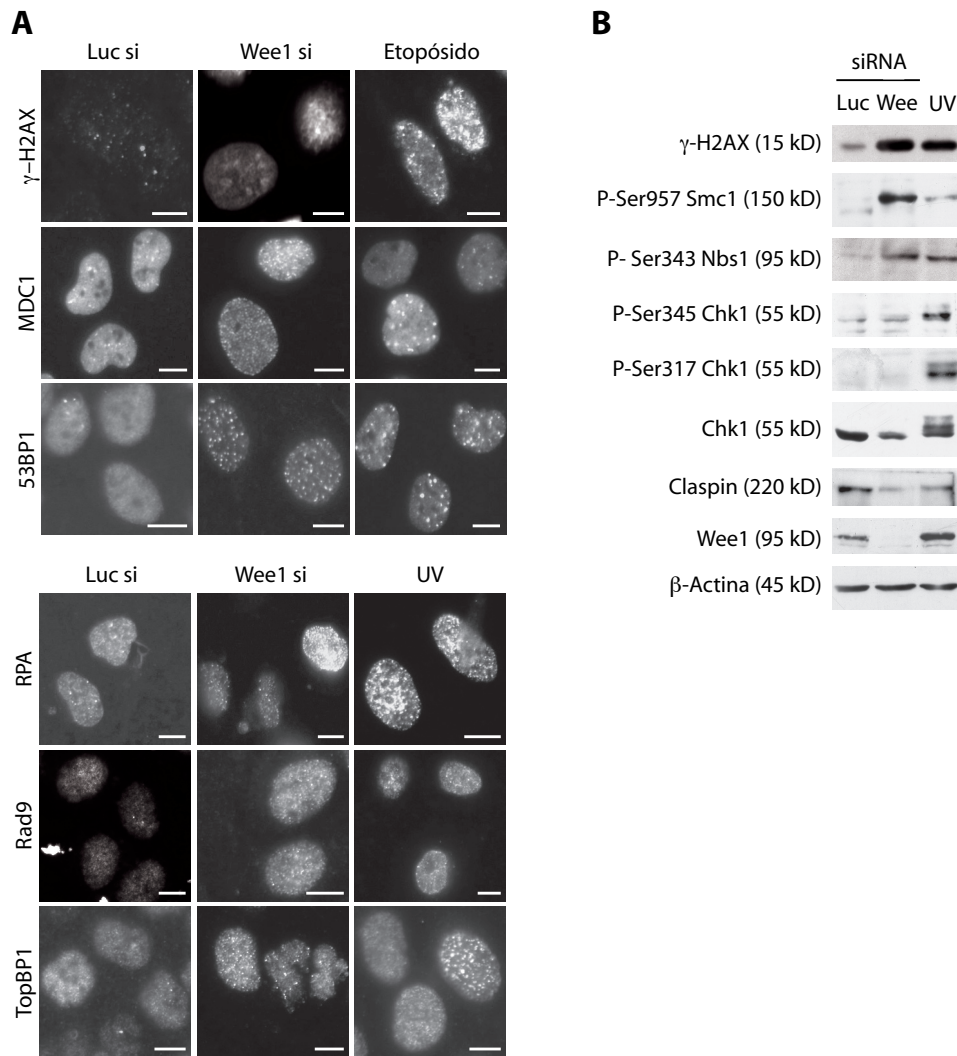
### 1.1 La ausencia de Wee1 activa tanto de la vía de ATR como la de ATM

Dado que la fosforilación de la histona H2AX se lleva a cabo tanto por ATR como por ATM y es un marcador común a la activación de las dos rutas, quisimos averiguar cuál de ellas, concretamente, se inducía en ausencia de Wee1. Así, estudiamos el efecto de la eliminación de Wee1 por inmunofluorescencia y *Western blot* sobre proteínas implicadas en cada una de estas vías de señalización.



Nuestros estudios de inmunofluorescencia demostraron que la supresión de Wee1 por siRNA resultaba en la característica formación de focos inducida por daño en el ADN de dos proteínas mediadoras de la vía de ATM: 53BP1 y MDC1. También inducía la formación de focos de RPA, TopBP1 y Rad9, indicadores de la existencia de un daño capaz de activar la vía de ATR (Figura 4A).

La activación de las dos vías en ausencia de Wee1 también se reflejó por *Western blot* a través de la fosforilación de Smc1 y Nbs1 y, curiosamente, también observamos un descenso de los niveles de Claspin y Chk1 en estas condiciones (Figura 4B), efecto que discutiremos más adelante.

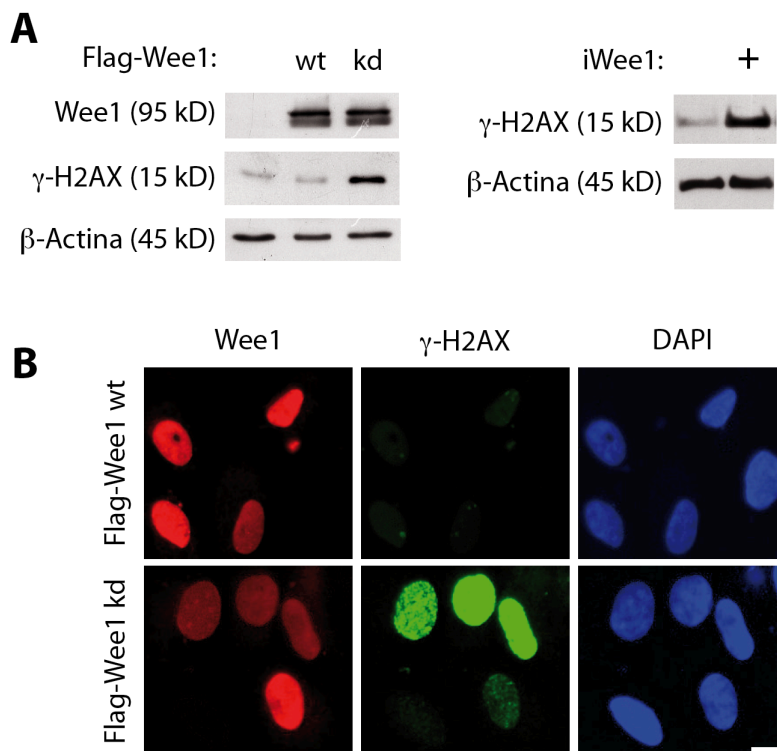


**Figura 4: La eliminación de Wee1 causa una respuesta general a daño en el ADN.** (A) Análisis por inmunofluorescencia usando los anticuerpos indicados de células U2OS transfectadas con siRNA contra Luciferasa o Wee1 durante 48 horas, o células tratadas con etopósido (20  $\mu$ M por 1 hora) o radiación UV (40 J/m<sup>2</sup> por 1 hora) como controles positivos de daño en el ADN. Para cada condición, se muestra un campo con una cantidad similar de células. Barras, 10  $\mu$ m. (B) Análisis por *Western blot* de células tratadas como se describe en A.

Estos resultados indican que la ausencia de Wee1 causa una activación general de la respuesta a daño y sugiere que en este contexto se producen tanto roturas de cadena sencilla como de la doble hebra del ADN.

## 1.2 La inhibición de la actividad quinasa de Wee1 causa la fosforilación de la histona H2AX

A continuación, quisimos determinar si la actividad quinasa de Wee1 era responsable de este fenotipo. Para ello, generamos un mutante catalíticamente inactivo (mutación de la lisina 328 por alanina, ver Materiales y Métodos) y estudiamos el posible efecto de dominante negativo de la sobreexpresión de este mutante en la célula. Efectivamente, la expresión de una versión catalíticamente inactiva de Wee1 demostró una inducción de  $\gamma$ -H2AX en comparación con la expresión de Wee1 silvestre tanto por *Western blot* (Figura 5A, panel izquierdo) como por inmunofluorescencia (Figura 5B). Esta observación fue corroborada utilizando un inhibidor de Wee1: la incubación de células U2OS a tiempos tan cortos como 4 horas, inducía la fosforilación de H2AX (Figura 5A, panel derecho), lo que demuestra que la actividad quinasa de Wee1 es necesaria para prevenir la activación de la respuesta a daño en el ADN de la célula.

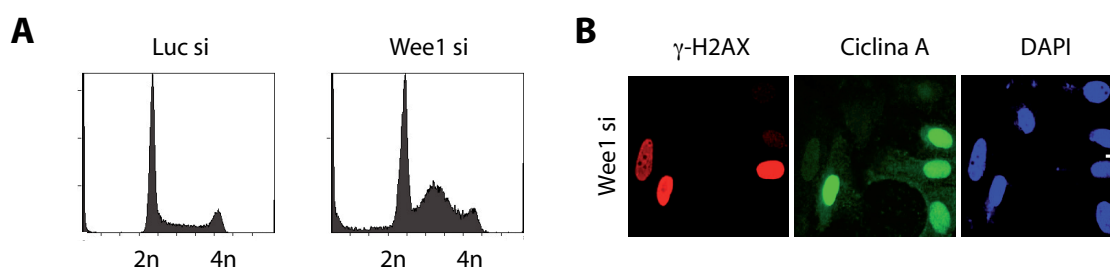


**Figura 5: La actividad quinasa de Wee1 es necesaria para prevenir la activación de la respuesta a daño en el ADN.** Células U2OS fueron transfectadas con un plásmido control o con plásmidos

que expresan las versiones silvestre (wt) o catalíticamente inactiva (kd) de Wee1 marcado con una etiqueta Flag, o bien tratadas con el inhibidor de Wee1 por 4 horas. Posteriormente, se analizó la fosforilación de H2AX mediante *Western blot* (A) e inmunofluorescencia (B). Barras, 10  $\mu$ m.

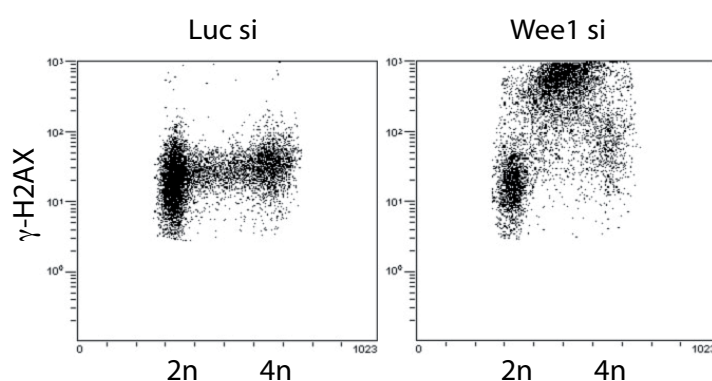
## 2. La inducción de la respuesta a daño en el ADN por la deficiencia de Wee1 tiene lugar en fase S

Dado que Wee1 es un conocido regulador del ciclo celular, quisimos estudiar su implicación en la inducción de daño en el DNA en relación a las distintas etapas del mismo. Para ello, llevamos a cabo experimentos de citometría de flujo en los que estudiamos la progresión a lo largo de las distintas fases del ciclo de células tratadas con siRNA control y contra Wee1. La eliminación de Wee1 resultó en una llamativa acumulación de células en la fase S del ciclo celular (Figura 6A), por lo que nos preguntamos si la activación de la respuesta podría estar ocurriendo en esta fase, lo que concordaría con el tipo de tinción de  $\gamma$ -H2AX observada por microscopía. Efectivamente, a través del análisis por inmunofluorescencia de los niveles de ciclina A, que no se detecta en fase G1, se expresa moderadamente en S y muestra niveles altos en G2, pudimos observar que la inducción de  $\gamma$ -H2AX por ausencia de Wee1 tenía lugar mayoritariamente en células en las fases S y G2 (Figura 6B).



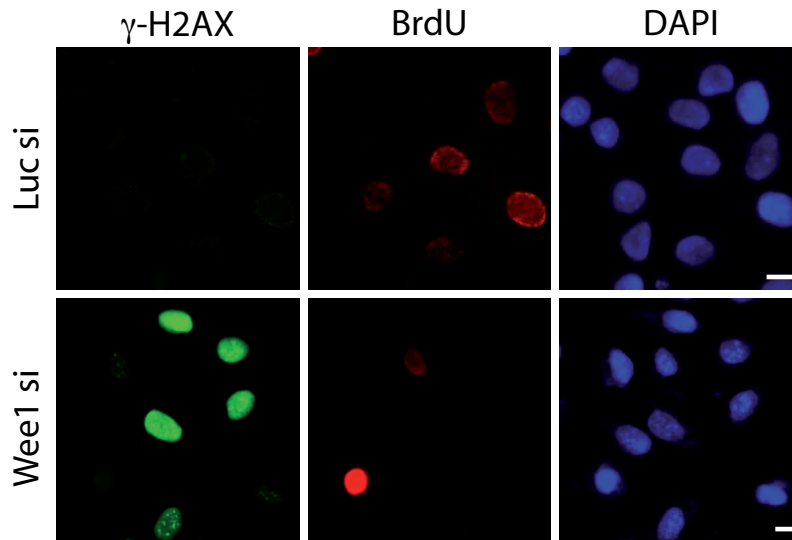
**Figura 6: La eliminación de Wee1 afecta a la progresión del ciclo durante la fase S.** (A) Células U2OS fueron transfectadas con siRNA contra Luciferasa o Wee1 y se determinaron los perfiles de ciclo celular por citometría de flujo tras teñir con yoduro de propidio. (B) Wee1 fue eliminada en células U2OS mediante un tratamiento con siRNA de 48 horas. Se llevó a cabo la técnica de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti- $\gamma$ -H2AX y anti-ciclina A. Barras, 10  $\mu$ m.

Además, estudios de citometría de flujo en los que analizamos la fosforilación de H2AX y el contenido de DNA, muestran que, en ausencia de Wee1, la mayoría de las células positivas para  $\gamma$ -H2AX se encuentran en fase S (Figura 7). Este hecho confirma los resultados observados mediante inmunofluorescencia (Figura 6B) e indica que la eliminación de Wee1 dispara la respuesta a daño en el ADN durante fase S.



**Figura 7: La inducción de  $\gamma$ -H2AX en ausencia de Wee1 tiene lugar en fase S.** Células U2OS fueron transfectadas con siRNA contra Luciferasa o Wee1. 48 horas más tarde, las células fueron fijadas y analizadas por citometría de flujo para los niveles de  $\gamma$ -H2AX y contenido en ADN, mediante la tinción con yoduro de propidio.

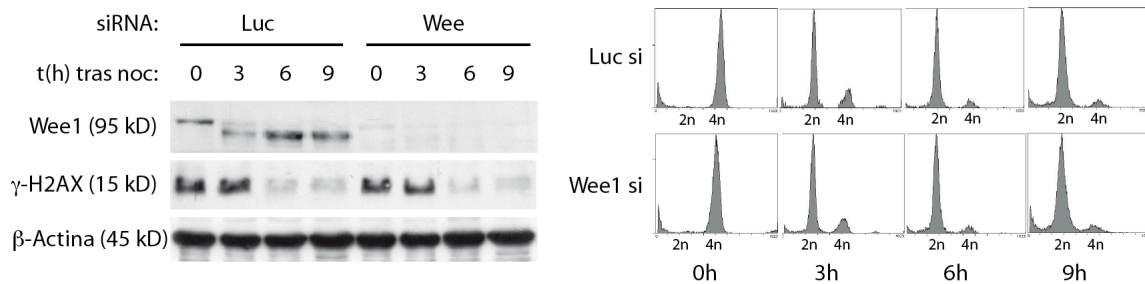
Nos resultó especialmente interesante descubrir que las células deficientes para Wee1 que mostraban altos niveles de  $\gamma$ -H2AX eran, además, células que no incorporaban BrdU al incubarse con este análogo de timidina por tiempos cortos (Figura 8), por lo que dedujimos que no estaban replicando de la misma manera que las células control. Sin embargo, cuando realizamos incubaciones por tiempos más largos observamos una tinción de BrdU en un elevado número de células. Todo ello sugiere que la eliminación de Wee1 causa una ralentización de la síntesis de ADN, pero no su total inhibición.



**Figura 8: La ausencia de Wee1 causa una disminución de la replicación.** Las células fueron transfectadas con los siRNA indicados y, tras 48 horas, las células fueron incubadas con BrdU por 10 minutos antes de la fijación y analizadas para  $\gamma$ -H2AX y BrdU por inmunofluorescencia. Barras, 10  $\mu$ m.

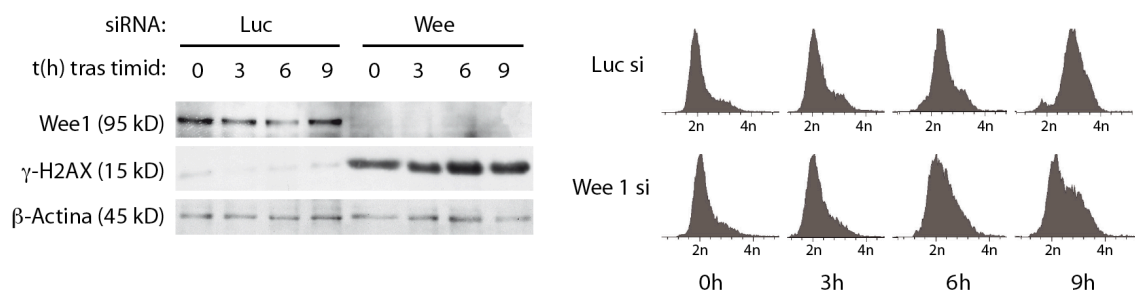
Para continuar demostrando que la activación de la respuesta a daño en el ADN en ausencia de Wee1 tiene lugar en fase S, sincronizamos las células en diferentes puntos del ciclo celular y estudiamos esta respuesta. Mediante el tratamiento con nocodazol, un inhibidor de la polimerización de microtúbulos que detiene las células en fase de mitosis (J.-G. Chen & Horwitz, 2002), obtuvimos células sincronizadas en dicha fase y en G1 (mediante liberación de la incubación con nocodazol). Usando timidina, un inhibidor de la síntesis de DNA (Bjursell & Reichard, 1973; Morris & Fischer, 1960), obtuvimos poblaciones de células en fase S temprana y tardía, y en fase G2.

Cuando incubamos células con nocodazol y las analizamos a diferentes tiempos tras la liberación, pudimos comprobar que los niveles de histona fosforilada se mostraban elevados en mitosis y G1 temprana, lo cual constituye un efecto previamente descrito (Ichijima et al., 2005; Quignon et al., 2006). Sin embargo, no observamos un efecto específico de la eliminación de Wee1 en estos puntos, ya que la inducción de  $\gamma$ -H2AX ocurría tanto en células control como carentes de Wee1 (Fig. 9).



**Figura 9: La eliminación de Wee1 no tiene un efecto específico en mitosis ni en G1.** Células U2OS fueron transfectadas con los siRNA indicados a la vez que fueron sincronizadas con nocodazol y, finalmente, liberadas de la incubación. A los tiempos indicados tras el arresto, las células fueron recogidas para su análisis por citometría de flujo para yoduro de propidio o análisis por *Western blot* con los anticuerpos indicados.

Por el contrario, en células en la transición G1/S y en progresión a través de fase S el incremento de  $\gamma$ -H2AX fue observado exclusivamente en células sin Wee1 (Figura 10), en comparación con células control, y en ellas observamos, además, un interesante efecto de retraso en la progresión a través de esta fase que estudiaremos con detalle en apartados siguientes. Todos estos resultados sugieren que es en este estadio del ciclo donde Wee1 podría estar ejerciendo su función como reguladora de la estabilidad genómica.



**Figura 10: La inducción de la respuesta a daño en el ADN en ausencia de Wee1 tiene lugar en fase S.** Células U2OS fueron transfectadas con los siRNA indicados a la vez que fueron sincronizadas con timidina y, finalmente, fueron liberadas de la incubación. A los tiempos indicados tras el arresto las células fueron recogidas para su análisis por citometría de flujo para yoduro de propidio o análisis por *Western blot* con los anticuerpos indicados.

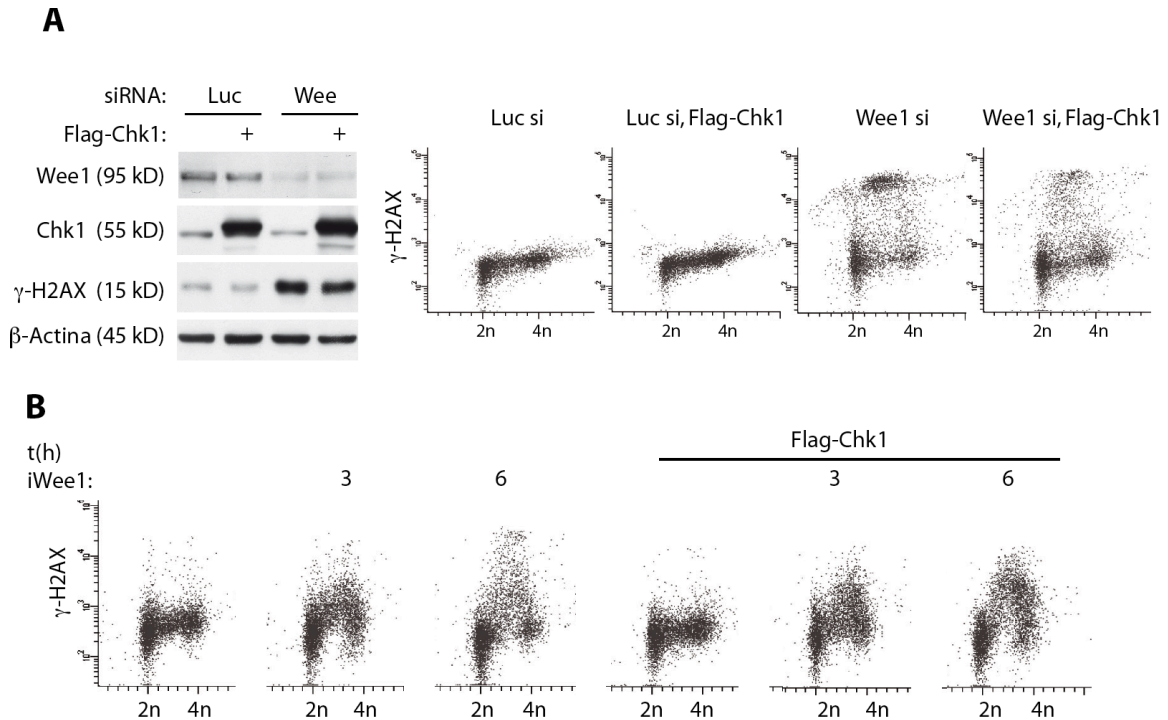
### ***3. La respuesta a daño en el ADN en ausencia de Wee1 no depende de Chk1***

A continuación quisimos investigar las posibles causas de la activación de esta respuesta a daño en ausencia de Wee1. Para ello, comenzamos centrándonos en el estudio de un efecto colateral que observamos en nuestros primeros experimentos: la eliminación de Wee1 causaba, además, un descenso en los niveles de la proteína Chk1 (Figura 1B).

Ya que ha sido descrito con anterioridad que la ausencia de Chk1 induce un incremento en los niveles de  $\gamma$ -H2AX en fase S (Maya-Mendoza, Petermann, Gillespie, Caldecott, & Jackson, 2007; Petermann et al., 2006; Syljuasen et al., 2005) nos preguntamos si la inducción de esta fosforilación en ausencia de Wee1 podría deberse, de manera indirecta, a una disminución en los niveles de Chk1.

Para probar esta hipótesis, estudiamos si la restauración de los niveles de Chk1 en ausencia de Wee1 prevenía la activación de esta respuesta. Comprobamos que la sobreexpresión de Chk1 no podía revertir la inducción de  $\gamma$ -H2AX en células carentes de Wee1 (Figura 11A), ni en aquéllas tratadas con un inhibidor específico para Wee1 (Figura 11B).

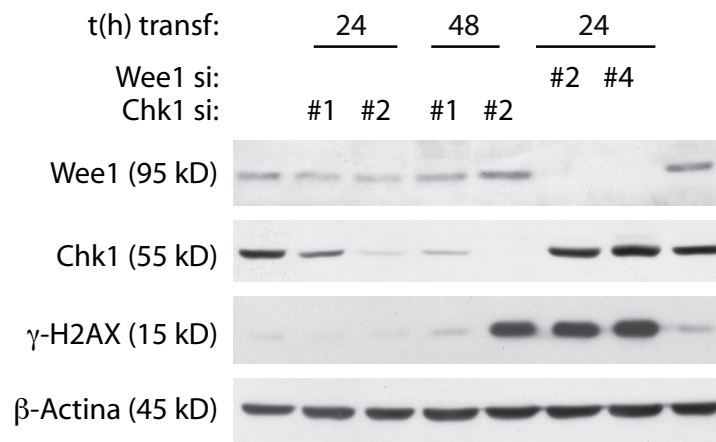




**Figura 11: La respuesta a daño inducida en ausencia de Wee1 no se debe a un descenso de Chk1.** (A) Análisis por citometría de flujo de células marcadas con un anticuerpo anti- $\gamma$ -H2AX y ioduro de propidio, o por *Western blot* con los anticuerpos indicados en células U2OS transfectadas con siRNA contra Luciferasa o Wee1, y plásmidos control o expresando Flag-Chk1 por 48 horas. (B) Se transfectaron células U2OS con el plásmido Flag-Chk1. Tras 36 horas, se añadió el inhibidor de Wee1 durante 3 o 6 horas. Luego, las células fueron recogidas y analizadas mediante citometría de flujo para  $\gamma$ -H2AX y ioduro de propidio,

Además, debido a que el descenso en los niveles de Chk1 en ausencia de Wee1 fue observado tras tratamientos largos con ARN interferente (48h, ver Figura 4B), realizamos un ensayo usando distintos tiempos de incubación, para estudiar si existía una correlación entre la falta de Wee1, el incremento de  $\gamma$ -H2AX y la reducción de Chk1. Observamos que la eliminación de Wee1 resultaba en la inducción de  $\gamma$ -H2AX tras tratamientos muy cortos con siRNA (Figura 12) y a esos tiempos los niveles de Chk1 aún no se habían visto afectados. Además, la inducción de  $\gamma$ -H2AX por la falta de Chk1 parece ser un proceso más lento, ya que sólo lo observamos 48 horas después de la transfección (Figura 12). En su conjunto, estos resultados demuestran que la inducción de  $\gamma$ -H2AX en

ausencia de Wee1 no puede ser explicada por una caída en los niveles de Chk1.



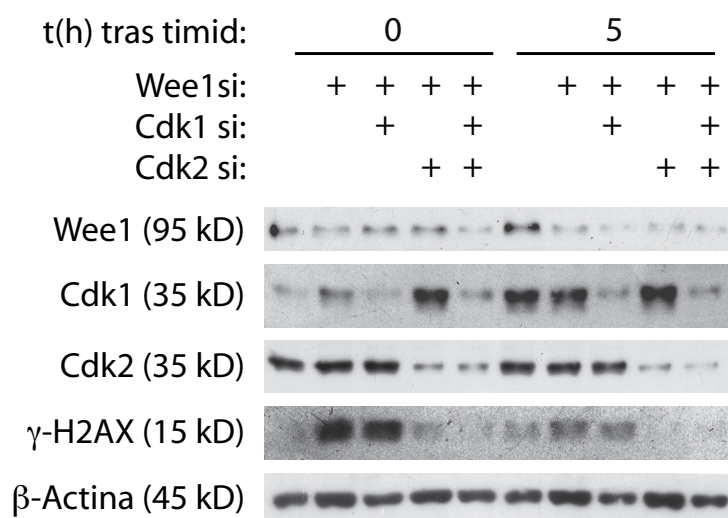
**Figura 12: La eliminación de Wee1 induce  $\gamma$ -H2AX cuando los niveles de Chk1 aún no se han visto afectados.** Análisis por *Western blot* con los anticuerpos señalados, de extractos de células U2OS realizados a los tiempos que se indican después de la transfección con siRNA.

#### ***4. La respuesta a daño en el ADN en ausencia de Wee1 no depende de Cdk1 pero sí de Cdk2***

Descartado el papel de Chk1 en el incremento de  $\gamma$ -H2AX por falta de Wee1, continuamos buscando una explicación para este fenotipo. La función más conocida y mejor documentada de Wee1 la sitúa como un importante inhibidor del complejo ciclina B/Cdk1 durante la fase G2, mediante la fosforilación en la treonina 14 y la tirosina 15 de Cdk1 (Haese et al., 1995; Russell & Nurse, 1987). Por ello, cabría esperar que la supresión de Wee1 pudiera resultar en una activación anormal de Cdk1 que, quizás, podría causar este fenotipo por una entrada prematura en una fase de ciclo celular. Para comprobarlo y con el fin de centrar nuestro estudio en fase G1/S y evitar efectos indirectos debidos a un descontrol en la transición G2/M, sincronizamos células en fase G1/S y estudiamos por *Western blot* e inmunofluorescencia si la ausencia de Cdk1 podría suprimir la respuesta en células sin Wee1 (sincronizaciones similares serán hechas a lo largo de todo el trabajo por la misma razón). La eliminación de Cdk1 en estas células no restauró los niveles normales de  $\gamma$ -H2AX, indicando que el

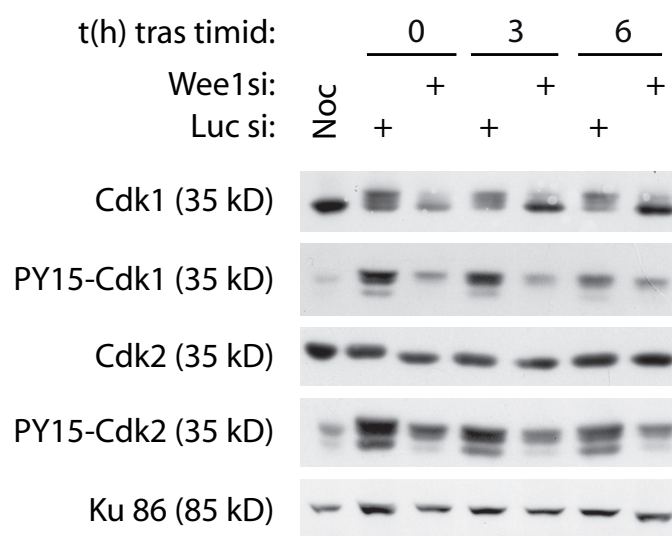
fenotipo observado no puede ser explicado por una sobreactivación de Cdk1 (Figura 13).

Dado que la inducción de la respuesta a daño en ausencia de Wee1 tiene lugar concretamente en fase S, nos preguntamos si guardaría alguna relación con problemas en la replicación provocados por una desregulación en la actividad de Cdk2, proteína clave en el inicio y la continuación de la síntesis de ADN mediante su asociación con las ciclinas E y A, respectivamente. Así, investigamos si la supresión de Cdk2 en ausencia de Wee1 podía revertir la activación de la respuesta. Efectivamente, al eliminar Cdk2 en células carentes de Wee1 pudimos ver una supresión de la fosforilación de la histona H2AX (Figura 13), sugiriendo la posibilidad de que una activación excesiva de Cdk2 por la ausencia de Wee1 podría ser la responsable de el fenotipo de activación de la respuesta a daño en el DNA de la célula.



**Figura 13: La eliminación de Cdk2 suprime la respuesta a daño en el ADN en ausencia de Wee1.** Células U2OS fueron incubadas por 12 horas con timidina y luego transfectadas, también en presencia de timidina, con siRNA contra Cdk1 o Cdk2 por 48 horas, y/o siRNA contra Wee1 por las últimas 24 horas. Después, donde se indica, las células fueron liberadas del arresto con timidina por 5 horas o mantenidas en el arresto antes de ser lisadas y analizadas con los anticuerpos indicados.

Para comprobar la implicación de Wee1 en el estado de activación de Cdk1 y Cdk2 durante la fase S, estudiamos, con anticuerpos fosfo-específicos, la fosforilación inhibitoria en la tirosina 15 de estas proteínas en células sin Wee1 y sincronizadas en fase S. Tanto la fosforilación de Cdk1 como la de Cdk2 se vio inhibida en ausencia de Wee1 (Figura. 14), demostrando que, aparte de su conocido papel como regulador de Cdk1 en la transición G2/M, Wee1 es capaz de controlar en fase S a Cdk1 y Cdk2 mediante fosforilación.



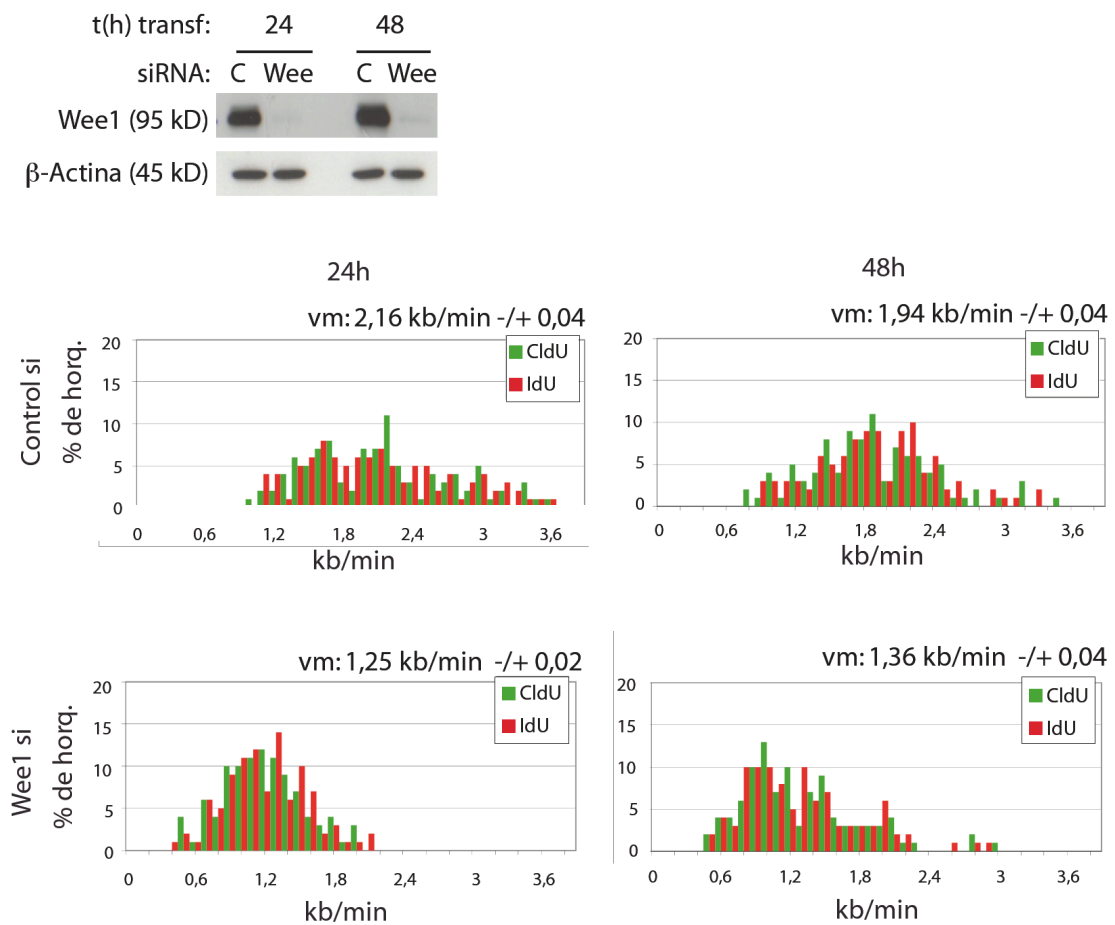
**Figura 14: Wee1 interviene en la fosforilación de Cdk1 y Cdk2 en fase S.** Células U2OS fueron incubadas con timidina por 12 horas y luego fueron transfectadas en presencia de timidina, con los siRNA indicados durante 24 horas y, finalmente, liberadas de esa incubación. A los tiempos indicados tras la liberación, las células fueron recogidas para su análisis por *Western blot* con los anticuerpos que se señalan. Las células sincronizadas en mitosis por tratamiento con nocodazol sirvieron como control para la fosforilación de Cdk1.

### ***5. Wee1 controla la velocidad de polimerización de la horquilla de replicación***

Los resultados obtenidos hasta el momento sugerían que Wee1 podría estar desempeñando un papel importante en la fase S, concretamente en replicación. Por ello, realizamos ensayos de fibras de cromatina en células marcadas con dos análogos de timidina (clorodesoxiuridina, CldU;

iododesoxiuridina, IdU) mediante pulsos sucesivos, técnica que permite, entre otras cosas, analizar la velocidad con la que avanza la horquilla de replicación (Anglana, Apiou, Bensimon, & Debatisse, 2003).

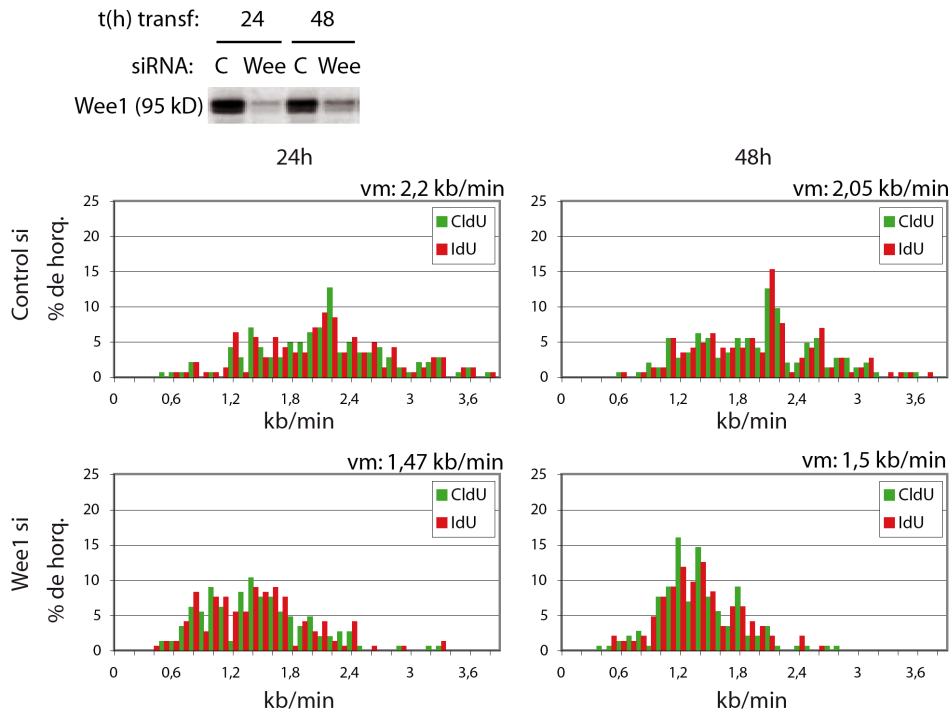
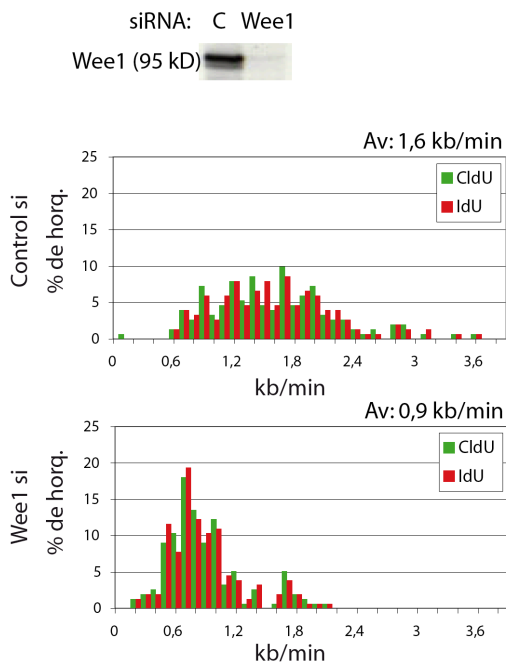
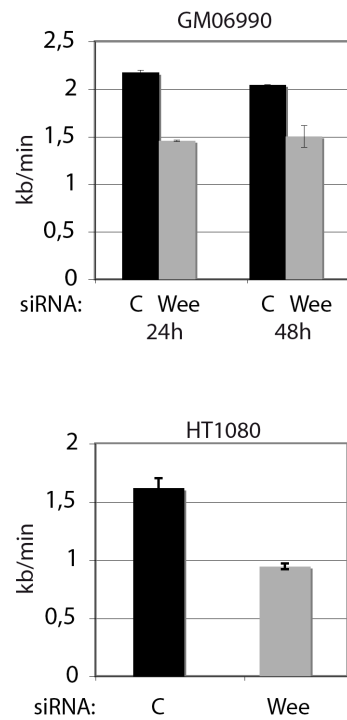
Estudiamos el efecto de la ausencia de Wee1 24 y 48 horas tras el tratamiento con siRNA en células U2OS y comprobamos que la eliminación de esta proteína reducía considerablemente la velocidad media de la horquilla de replicación de 2,16 a 1,25 kb/min, a tiempos cortos tras la transfección, y este efecto persistía a tiempos más largos (Figura 15).



**Figura 15: La eliminación de Wee1 causa la ralentización del movimiento de la horquilla de replicación.** Células U2OS fueron transfectadas con siRNA control o contra Wee1 por los tiempos indicados y posteriormente sometidas a pulsos sucesivos para IdU y CldU. La velocidad de la horquilla de replicación fue determinada mediante la medición de la longitud de los segmentos de IdU y CldU en fibras de ADN. Las gráficas muestran los porcentajes de las

moléculas con las velocidades de un experimento representativo. Sobre cada gráfica se muestra la velocidad media con el error estándar de la media de tres experimentos diferentes. El *Western blot* muestra la eficacia de la eliminación de Wee1.

Para asegurarnos de que no se trataba de un efecto asociado al tipo celular, realizamos los mismos experimentos en otras líneas celulares, obteniendo resultados similares: el tratamiento de células linfoblastoides GM06990 o fibroblastos humanos HT1080 con siRNA contra Wee1, causaba una reducción de la velocidad media de la horquilla de replicación similar al observado en células U2OS (de 2,2 kb/min a 1,47 kb/min en células linfoblastoides humanas GM06990, y de 1,6 kb/min a 0,9 kb/min en fibroblastos HT1080, en comparación con una reducción de 2,16 kb/min a 1,25 kb/min en células U2OS tras 24 horas de tratamiento con siRNA) por lo que descartamos esta posibilidad (Figura 16).

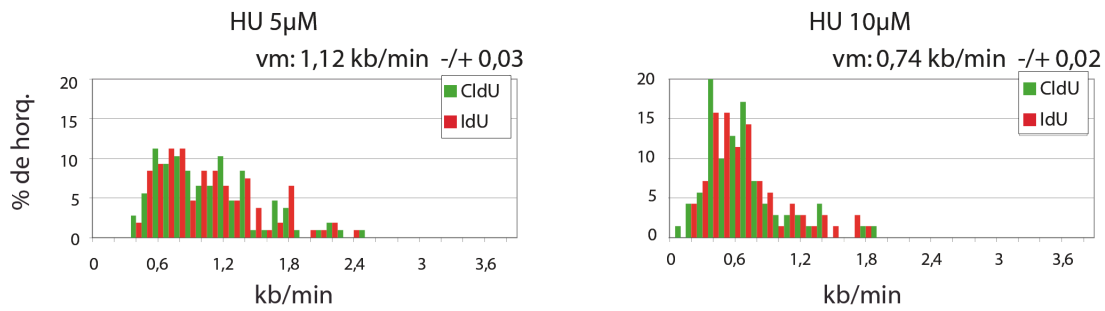
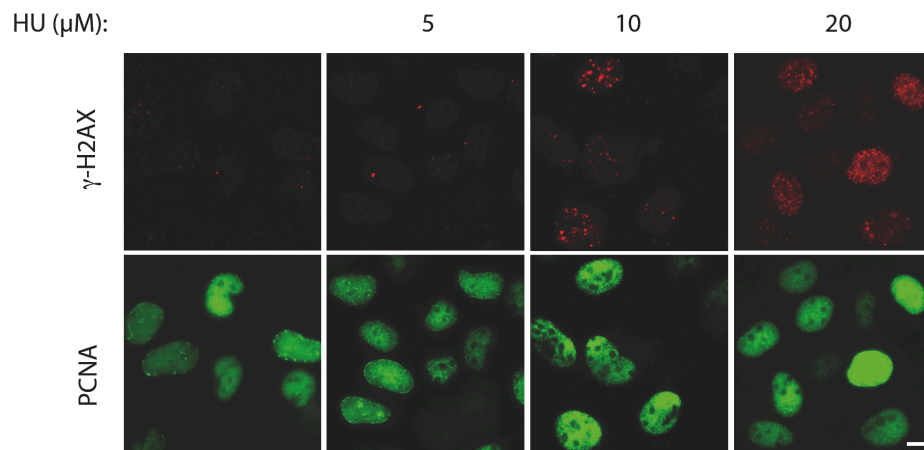
**A****B****C**

**Figura 16: El efecto de la eliminación de Wee1 sobre la velocidad de la horquilla es independiente del tipo celular.** Células linfoblastoides humanas GM06990 (A) o fibroblastos humanos no-transformados HT1080 (B) tratados como se describe en la figura 15. (C) Velocidad media de la horquilla, con las medidas obtenidas en células GM06990\_o HT1080 correspondiente a tres experimentos independientes. Las barras muestran el error estándar.

## ***6. La deficiencia en la velocidad de replicación no causa un aumento significativo de $\gamma$ -H2AX***

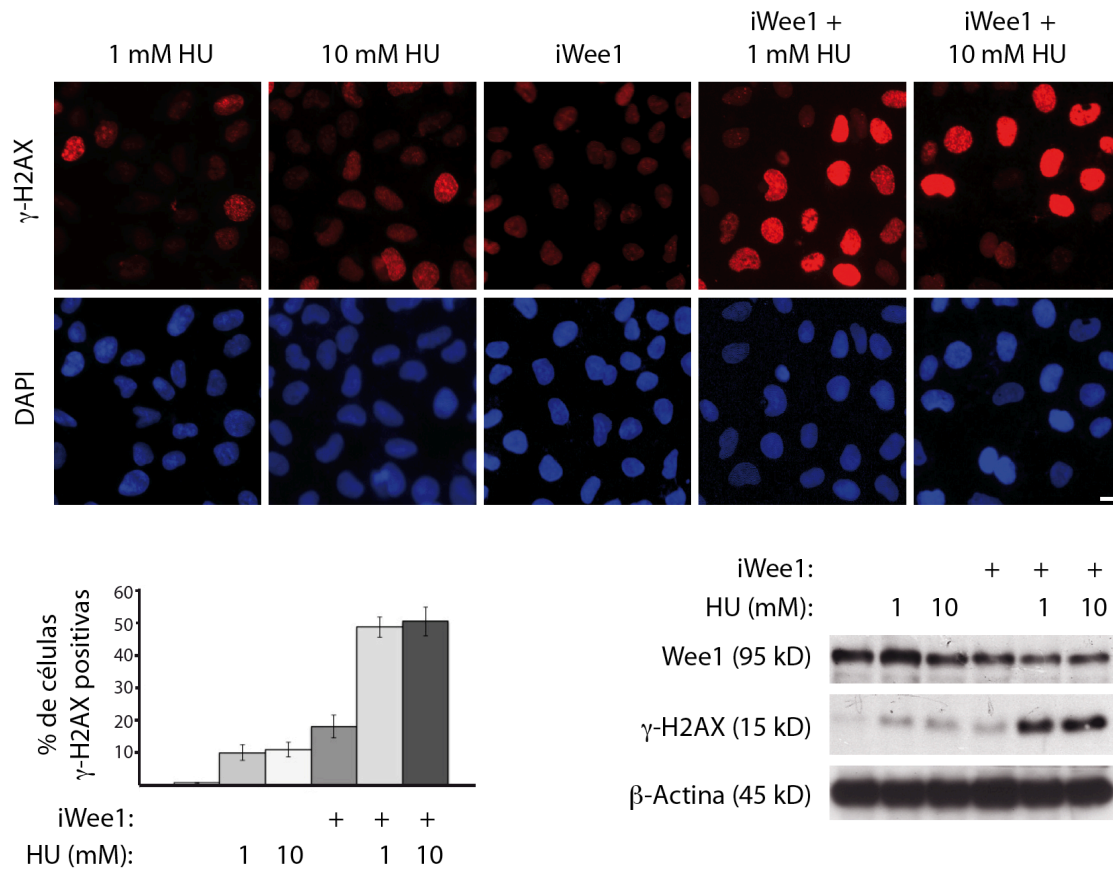
Con el fin de determinar si la reducción en la velocidad de la horquilla observada en ausencia de Wee1 es directamente responsable de la activación de la respuesta a daño en el ADN, tratamos células U2OS con varias concentraciones de hidroxIUrea (HU), un agente que causa el bloqueo de las horquillas de replicación. En comparación con células control, con una dosis tan baja como 5  $\mu$ M de HU observamos una ralentización de la horquilla similar a la observada en ausencia de Wee1 (2,16 kb/min en células control, frente a 1,25 kb/min en células sin Wee1 y 1,12 kb/min en células tratadas con 5  $\mu$ M HU) (Figuras 15 y 17A). Sin embargo, en estas condiciones (5  $\mu$ M de HU) no pudimos observar la inducción de  $\gamma$ -H2AX (Figura 17B). Esto indica que la activación de la respuesta a daño en el ADN causada por la supresión de Wee1 no es solamente consecuencia de un descenso en la velocidad de la horquilla de replicación.



**A****B**

**Figura 17: La ralentización de la horquilla en ausencia de Wee1 no explica la inducción de la respuesta a daño.** Células U2OS fueron tratadas con las concentraciones de HU indicadas por 24 horas. Posteriormente, las células fueron sometidas a pulsos para IdU y CldU (A) y analizadas como se describe en la figura 15 o teñidas con los anticuerpos indicados, para su análisis por inmunofluorescencia (B). Barras, 10  $\mu$ m.

Debido a todos los resultados descritos, pensamos que Wee1 podría tener un papel en la estabilización de las horquillas bloqueadas y, por tanto, en su ausencia problemas en la replicación acabarían resultando en el colapso de las mismas. Si éste fuera el caso, la inhibición de Wee1 sumada a un breve tratamiento con HU debería provocar una mayor activación de la respuesta a daño. Efectivamente, pudimos demostrar que, mientras tratamientos cortos con el inhibidor de Wee1 o con HU no resultaban en una inducción de  $\gamma$ -H2AX, el tratamiento combinado con ambos agentes causaba una clara activación de la respuesta a daño, como se pudo observar a través de la medición de  $\gamma$ -H2AX por *Western blot* e inmunofluorescencia (Figura 18).



**Figura 18: Wee1 protege la estabilidad de las horquillas de replicación bloqueadas.** Células U2OS fueron tratadas con el inhibidor de Wee1. Tras 1 hora, se añadió HU a las concentraciones indicadas y, finalmente, se recogieron y analizaron las células por inmunofluorescencia o *Western blot* utilizando los anticuerpos que se señalan. Las gráficas representan la cuantificación de la inmunofluorescencia, indicando el porcentaje de células positivas para  $\gamma$ -H2AX. Se contaron un mínimo de 1000 células para cada muestra. Las barras de error representan el error estándar de la media de dos experimentos independientes. Barras, 10  $\mu$ m.

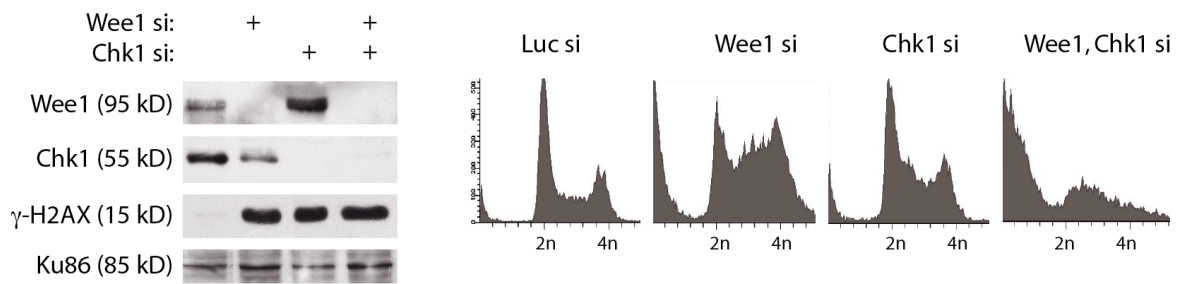
Todo esto nos lleva a pensar que Wee1 puede tener un papel fundamental en la replicación, posiblemente favoreciendo la estabilización de las horquillas de replicación bloqueadas, y su ausencia puede conllevar a un incorrecto procesamiento de las mismas y a la consecuente activación de la respuesta a daño en el ADN.

## ***7. Wee1 y Chk1 realizan funciones similares, pero en vías diferentes, durante la replicación del ADN***

Como se ha descrito antes, la falta de Chk1 en fase S causa un fenotipo similar al observado en ausencia de Wee1: elevados niveles de  $\gamma$ -H2AX y retraso en la replicación. Ha sido descrito que la eliminación de Chk1 por siRNA o la inhibición de su actividad catalítica causa un descontrol en la activación de los orígenes de replicación, lo que conlleva a una iniciación anormalmente elevada de la replicación, que causa el acúmulo de estructuras aberrantes de la horquilla de replicación, y la activación de la respuesta a daño dependiente de ATR, procesos dependientes de Cdk2 (Maya-Mendoza et al., 2007; Petermann, Woodcock, & Helleday, 2010).

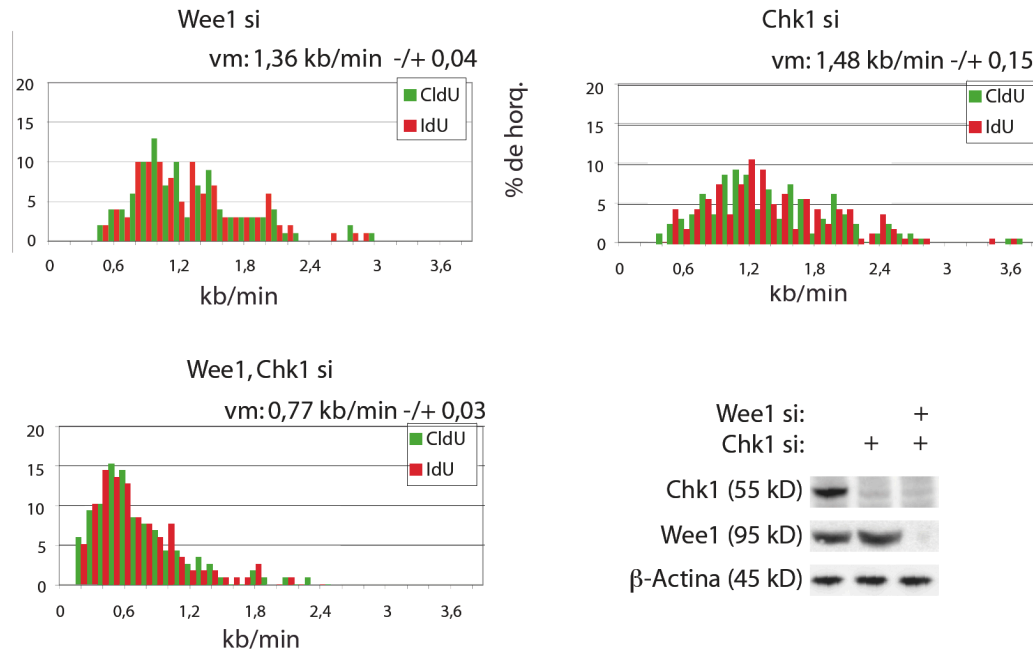
Como hemos comentado, la inhibición de la expresión de Wee1 a tiempos largos causa la caída de los niveles de Chk1, pero este efecto no tiene una gran relevancia en la activación de la respuesta a daño en ausencia de Wee1 (Figura 11). Sin embargo, se ha descrito una conexión a nivel funcional entre estas dos proteínas en la activación de la parada de ciclo celular en presencia de daño en el ADN durante la fase G2 (J. Lee et al., 2001). Por ello y por la similitud entre los fenotipos asociados a la falta de Wee1 y Chk1, estudiamos si estas dos proteínas estaban actuando en la misma ruta de señalización o no, midiendo el efecto de la eliminación simultánea de ambas sobre los distintos aspectos de este fenotipo. Si Wee1 y Chk1 estuvieran actuando en la misma vía, su supresión conjunta no tendría un efecto sumatorio con respecto a la supresión individual. Sin embargo, si se encontraran actuando en rutas diferentes con el objetivo común de preservar la estabilidad del genoma, la ausencia de ambas proteínas causaría el bloqueo de las dos rutas, resultando en una respuesta sinérgica.

La ausencia simultánea de Wee1 y Chk1 no causó un aumento en los niveles de  $\gamma$ -H2AX en comparación con la supresión individual, pero a diferencia de la eliminación individual, la amplia mayoría de células sin ambas proteínas sufrieron apoptosis, según la población sub-G1 observada por citometría de flujo (Figura 19). Este hecho sugiere que en células sometidas a doble tratamiento contra Chk1 y Wee1 se genera un daño más intenso que en las deficientes para una sola de las proteínas y, por tanto, la ausencia de estas dos proteínas posee un efecto sinérgico.



**Figura 19: Wee1 y Chk1 protegen a la célula de problemas en replicación por rutas distintas.** Análisis por *Western blot* y citometría de flujo tras la tinción con ioduro de propidio de células U2OS transfectadas durante 48 horas con siRNA contra Luciferasa, Wee1, Chk1, o combinaciones de éstos.

Esta misma sinergia se observa en la velocidad de la horquilla de replicación. Así, mientras la eliminación de Chk1 reduce la velocidad de la horquilla en similar medida a la eliminación de Wee1 (1,94 kb/min en células control frente a 1,48 kb/min en células sin Wee1 y 1,36 kb/min en células sin Chk1), la supresión simultánea de las dos proteínas resultó en una ralentización aditiva de la horquilla de replicación (0,77 kb/min) (Figura 20).



**Figura 20: La eliminación de Wee1 y Chk1 tiene un efecto sinérgico negativo sobre la progresión de la horquilla.** Células U2OS fueron transfectadas con los siRNA indicados durante 48 horas, y posteriormente, sometidas a pulsos para IdU y CldU. La velocidad de la horquilla de replicación fue determinada mediante la medición de la longitud de los segmentos de IdU y CldU en fibras de ADN. Las gráficas muestran los porcentajes de las moléculas con las velocidades de un experimento representativo. Sobre cada gráfica se muestra la velocidad media con el error estándar de la media de tres experimentos diferentes. El *Western blot* muestra la eficacia de la eliminación de Wee1 y Chk1.

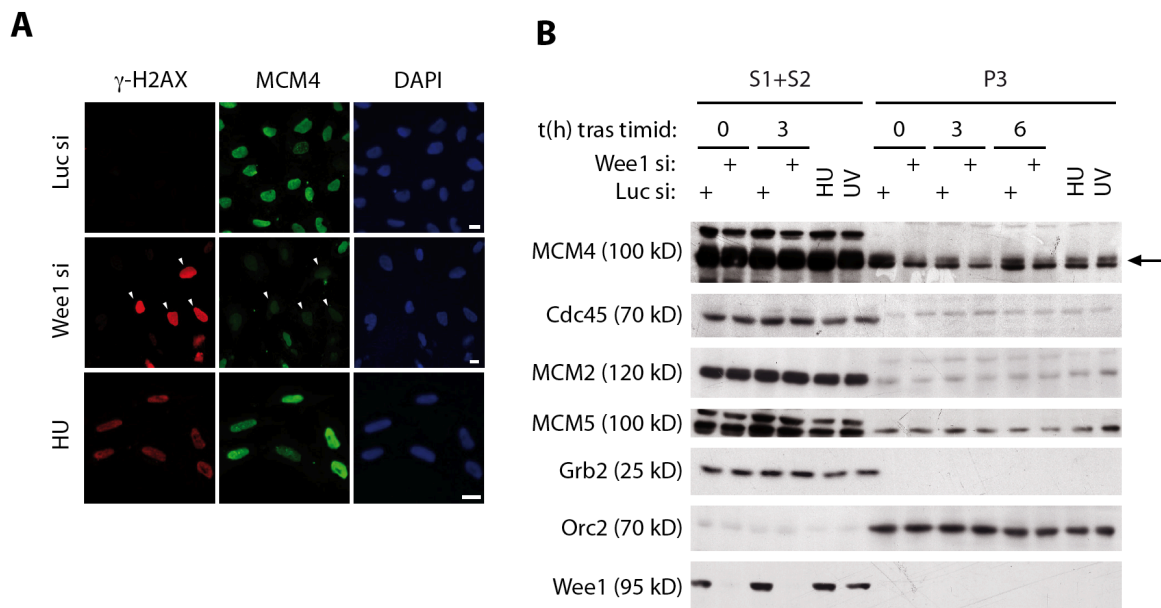
En su conjunto, estos resultados indican consistentemente que Wee1 y Chk1 tienen papeles similares y complementarios en garantizar una correcta replicación mediante vías diferentes.

### ***8. La ausencia de Wee1 afecta a la unión a cromatina de algunas proteínas de replicación***

Para estudiar la causa del descenso en la velocidad de la replicación en ausencia de Wee1, quisimos monitorizar la estabilidad de las horquillas estudiando los niveles de expresión de las proteínas de replicación y su

capacidad para asociarse a la cromatina. Uno de los pasos iniciales de la replicación es el ensamblaje de las proteínas MCM (MCM2-7) en la cromatina. Éstas, en asociación con el factor de iniciación Cdc45 y el complejo GINS, poseen la actividad helicasa que abre la doble hebra de ADN para su utilización como molde en la replicación y su unión a cromatina permite la formación de los complejos de pre-replicación, sin los cuales este proceso no puede continuar (Sclafani & Holzen, 2007). Por ello, estudiamos la asociación a cromatina de distintos componentes de este complejo.

En nuestro estudio detectamos un descenso en la unión a cromatina de la subunidad MCM4 en células sin Wee1 en comparación con células control, como pudimos ver tanto por fraccionamiento de la cromatina (Figura 21B) como por inmunofluorescencia, tras una breve permeabilización previa a la fijación (Figura 21A).

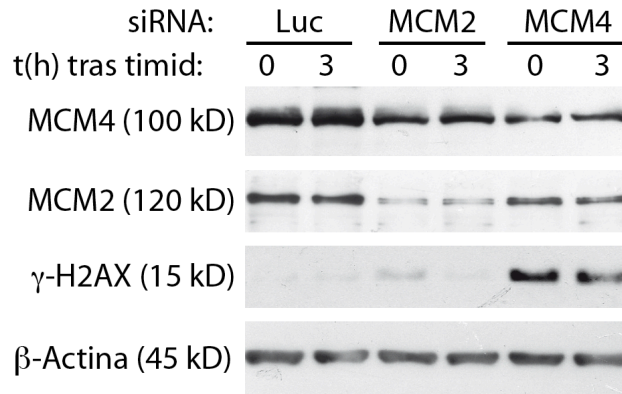


**Figura 21: La eliminación de Wee1 previene la unión de MCM4 a cromatina.** (A) Células U2OS fueron transfectadas con siRNA contra Luciferasa o Wee1. Tras 48 horas, las células fueron dejadas sin tratar o tratadas con detergente previamente a la fijación y se analizaron por inmunofluorescencia con los anticuerpos indicados. Para cada condición se muestran campos con similar cantidad de células. Las puntas de flecha indican células con altos niveles de histona H2AX fosforilada y bajos niveles de MCM4. Barras, 10  $\mu$ m. (B) Las células fueron transfectadas como en A y sincronizadas con

timidina. Posteriormente, fueron liberadas por los tiempos indicados o mantenidas en el arresto, y fueron recogidas. Se llevó a cabo el fraccionamiento bioquímico de la cromatina tal como se indica en Materiales y Métodos, y se analizaron las distintas fracciones por *Western blot* con los anticuerpos que se indican. Tratamientos con HU (10 mM por 1 hora) o radiación UV (40 J/m<sup>2</sup>) fueron empleados como control para la inducción de daño en fase S. Las flechas indican la banda correspondiente a MCM4, que desciende en células sin Wee1. P3, fracción de cromatina; S1 + S2, proteínas solubles.

Ha sido descrito con anterioridad que una disminución en los niveles de proteínas del complejo MCM2-7, a pesar de no tener un efecto sobre la velocidad de progresión de la horquilla, sí causa problemas en la replicación por incrementar la sensibilidad de las células al estrés replicativo de una fase S normal (Ibarra, Schwob, & Méndez, 2008). Esta sensibilización se produce ya que la célula es incapaz de activar los orígenes de replicación latentes en caso de estrés replicativo, lo que conlleva a la acumulación de estructuras aberrantes de la horquilla de replicación y a una consecuente activación de la respuesta a daño.

Sin embargo, la eliminación de Wee1 no afectó a la unión de otras proteínas como MCM2, MCM5 o CDC45 (Figura 21B). Tras estos resultados y para estudiar si, específicamente, la falta de MCM4 provocaba una respuesta a daño en el ADN, quisimos estudiar el efecto de la eliminación de los componentes MCM2 y MCM4 durante la fase S sobre la fosforilación de la histona H2AX. Ciertamente, la supresión de MCM4 y no la de MCM2 resultó en un aumento de  $\gamma$ -H2AX en comparación con células control (Figura 22).



**Figura 22: La eliminación de MCM4 causa la activación de la respuesta daño en el ADN.** Células U2OS fueron transfectadas con siRNA contra Luciferasa, MCM2 o MCM4 y, posteriormente, sincronizadas con timidina. Se liberaron las células por 3 horas o se mantuvieron en presencia de timidina y, finalmente, fueron lisadas y analizadas por *Western blot* con los anticuerpos indicados.

### ***9. La respuesta a daño en el ADN en ausencia de Wee1 depende de la endonucleasa Mus81-Eme1***

Paralelamente a los estudios sobre las proteínas implicadas en el inicio de la replicación, e inspirados por estudios anteriores que demuestran el control de la quinasa del *checkpoint* Cds1 sobre la actividad de la endonucleasa Mus81 en *S. pombe* (Boddy et al., 2000; Kai, Boddy, Russell, & Wang, 2005), nos preguntamos si el efecto de la falta de Wee1 en la activación del daño en el ADN podría estar relacionado con la actividad de alguna proteína que procesara las horquillas de replicación bloqueadas y generara daño en el ADN.

De este modo, probamos diferentes candidatas cuyo papel en el procesamiento de intermediarios de replicación ha sido previamente descrito (ver figura I 9 del capítulo *Introducción*). En concreto, estudiamos si su supresión revertía el fenotipo en ausencia de Wee1. Las proteínas estudiadas fueron las siguientes:

#### *BLM:*

BLM pertenece a una familia de helicasas de ADN llamada RecQ,



altamente conservadas en la evolución. Posee un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad genómica como parte del el complejo BTR, junto con la topoisomerasa IIIa, RMI1 y RMI2 (Mankouri & Hickson, 2007; L. Wu & Hickson, 2003), resolviendo estructuras intermediarias en la reparación del ADN por recombinación homóloga (Cheok et al., 2005; S. Sharma, Sommers, & Brosh, 2008).

#### Gen1:

Gen1 es una resolvasa de estructuras de cuatro brazos o *Holliday junctions*, las cuales son enzimas con actividad endonucleasa capaces de resolver este tipo de estructuras mediante la introducción de incisiones en distintos puntos. Se le ha atribuido una doble función tanto en la señalización del daño en el ADN, como en la reparación de roturas de la doble hebra (Bailly et al., 2010; Ip et al., 2008).

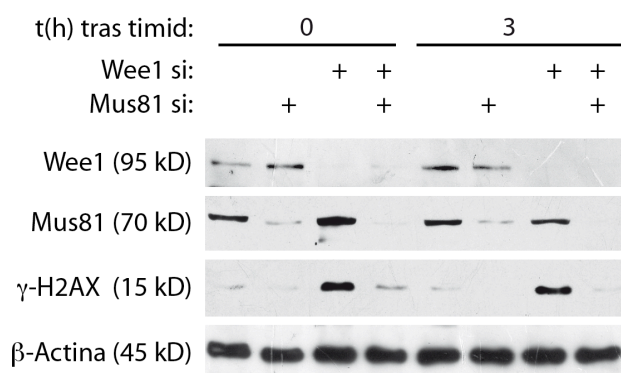
#### Exo1:

Es una exonucleasa relacionada con diversos procesos metabólicos en eucariotas, como reparación del ADN, recombinación, replicación o el mantenimiento de la integridad de los telómeros (Tomimatsu et al., 2012). Trabajos anteriores muestran la implicación de Exo1 en el colapso de las horquillas de replicación inducido por el tratamiento con HU (Cotta-Ramusino et al., 2005), y que la eliminación de esta exonucleasa revierte la inestabilidad de las horquillas inducida por agentes causantes de daño en el ADN en mutantes para Rad53 de *S. cerevisiae* (Segurado & Diffley, 2008).

#### Mus81-Eme1:

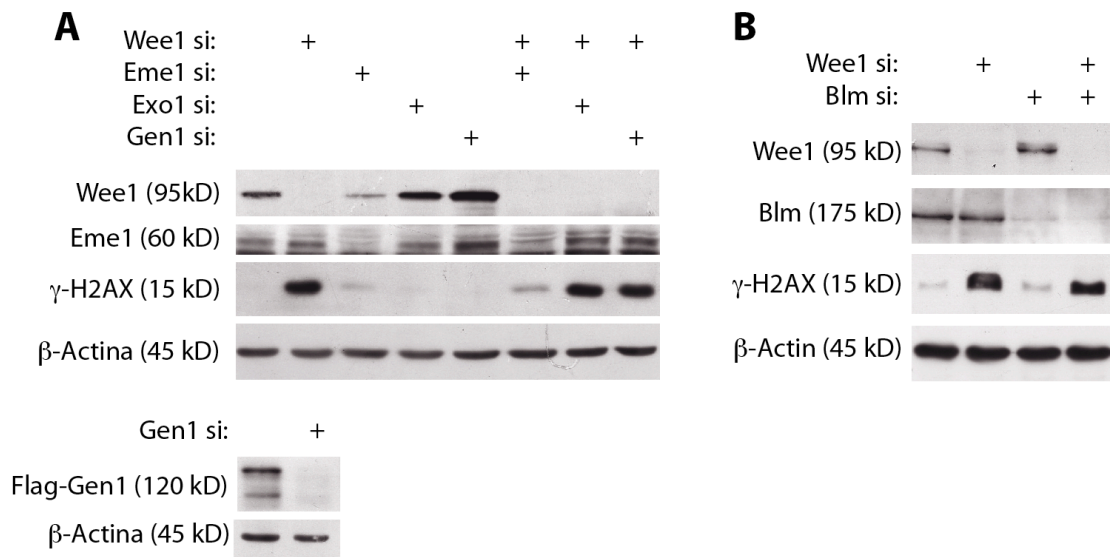
Mus81-Eme1 es una endonucleasa heterodimérica en la que la primera subunidad posee la actividad catalítica y la segunda la actividad reguladora. Está implicada en el procesamiento de horquillas de replicación bloqueadas, para lo que causa roturas temporales en la doble hebra del ADN, y ha sido relacionada con el mantenimiento de la estabilidad genómica, generando estructuras intermedias más susceptibles a ser reparadas (Hanada et al., 2007).

En nuestros experimentos única y específicamente la endonucleasa Mus81-Eme1 mostró estar implicada en el incremento de  $\gamma$ -H2AX en ausencia de Wee1, ya que la eliminación de Mus81, subunidad catalítica (Figura 23), o de Eme1, subunidad reguladora (Figura 24A), causó una disminución en la señal de  $\gamma$ -H2AX en células sin Wee1, indicando que su actividad es crítica para la activación de esta respuesta a daño.



**Figura 23: La eliminación de Mus81 rescata el daño y el retraso en fase S inducido por la ausencia de Wee1:** (A) Células U2OS fueron transfectadas con siRNA contra Luciferasa o Mus81 durante 48 horas en presencia de timidina. Durante las últimas 24 horas, las células fueron transfectadas, además, con siRNA contra Luciferasa o Wee1. Después, fueron liberadas o no del arresto con timidina y analizadas con los anticuerpos indicados.

Sin embargo, demostramos que la eliminación de Exo1, Gen1 o BLM no pudo revertir la inducción de  $\gamma$ -H2AX como consecuencia de la falta de Wee1, por lo que estas enzimas no parecen estar implicadas en esta respuesta (Figura 24).



**Figura 24: Eme1 está implicada en el daño causado por la falta de Wee1, pero no otras nucleasas distintas a Mus81-Eme1.** (A) Células U2OS fueron transfectadas con siRNA contra Eme1, Exo1 o Gen1. Tras 24 horas, se transfectaron con siRNA contra Wee1 donde se indica. 24 horas más tarde, las células fueron lisadas y los extractos analizados por *Western blot* usando los anticuerpos que se indican. La eficiencia del tratamiento con siRNA contra Gen1, a falta de un anticuerpo óptimo para esta proteína, se comprobó transfectando células U2OS con un plásmido Flag-Gen1 y siRNA contra Gen1, simultáneamente. Tras 48 horas las células fueron lisadas y analizadas por *Western blot* usando un anticuerpo anti-Flag. (B) Células U2OS fueron transfectadas con siRNA contra BLM. Tras 48 horas, fueron transfectadas con siRNA contra Wee1 donde se indica, por otras 24 horas. Posteriormente, las células fueron lisadas y analizadas por *Western blot* con los anticuerpos que se indican.

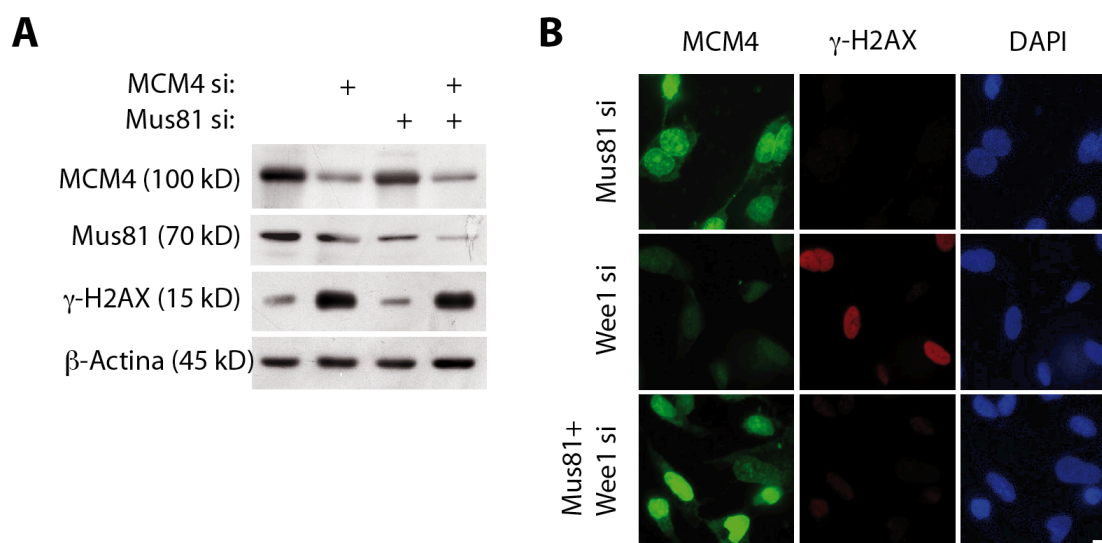
### ***10. Mus81 está implicada en la respuesta a daño en ausencia de Wee1, pero no en la generada en ausencia de MCM4***

A continuación y retomando los resultados comentados en relación a MCM4, nos preguntamos si el defecto de su unión a cromatina en ausencia de Wee1 podría estar implicado en la respuesta a daño. Si la falta de MCM4 en la cromatina fuera un evento fundamental en la respuesta a daño en el ADN en ausencia de Wee1, y estas tres proteínas formaran parte de la misma respuesta, esperaríamos que la inhibición de Mus81 también revirtiera el daño en ausencia de MCM4. Sin embargo, dos observaciones

nos llevaron a descartar una implicación directa de MCM4 en la activación de la respuesta a daño por falta de Wee1:

Por una lado, la supresión de Mus81 no fue capaz de prevenir la inducción de daño por falta de MCM4 (Figura 25A), resultado que indica que se trata de dos respuestas diferentes, y, por otro lado, la supresión de Mus81 no sólo revertía el daño causado por la falta de Wee1, sino que, además, devuelve una unión de la proteína MCM4 a la cromatina comparable a una situación control (Figura 25B).

Tomados en conjunto, estos resultados nos sugerían un papel central de Mus81 en la respuesta a daño generada en ausencia de Wee1, mientras que MCM4 parece tener un efecto secundario en esta respuesta y encontrarse corriente abajo de estas dos proteínas. Por tanto, creemos que la liberación de MCM4 de la cromatina en este contexto puede ser más una consecuencia del daño generado en el ADN que la causa de este fenotipo.

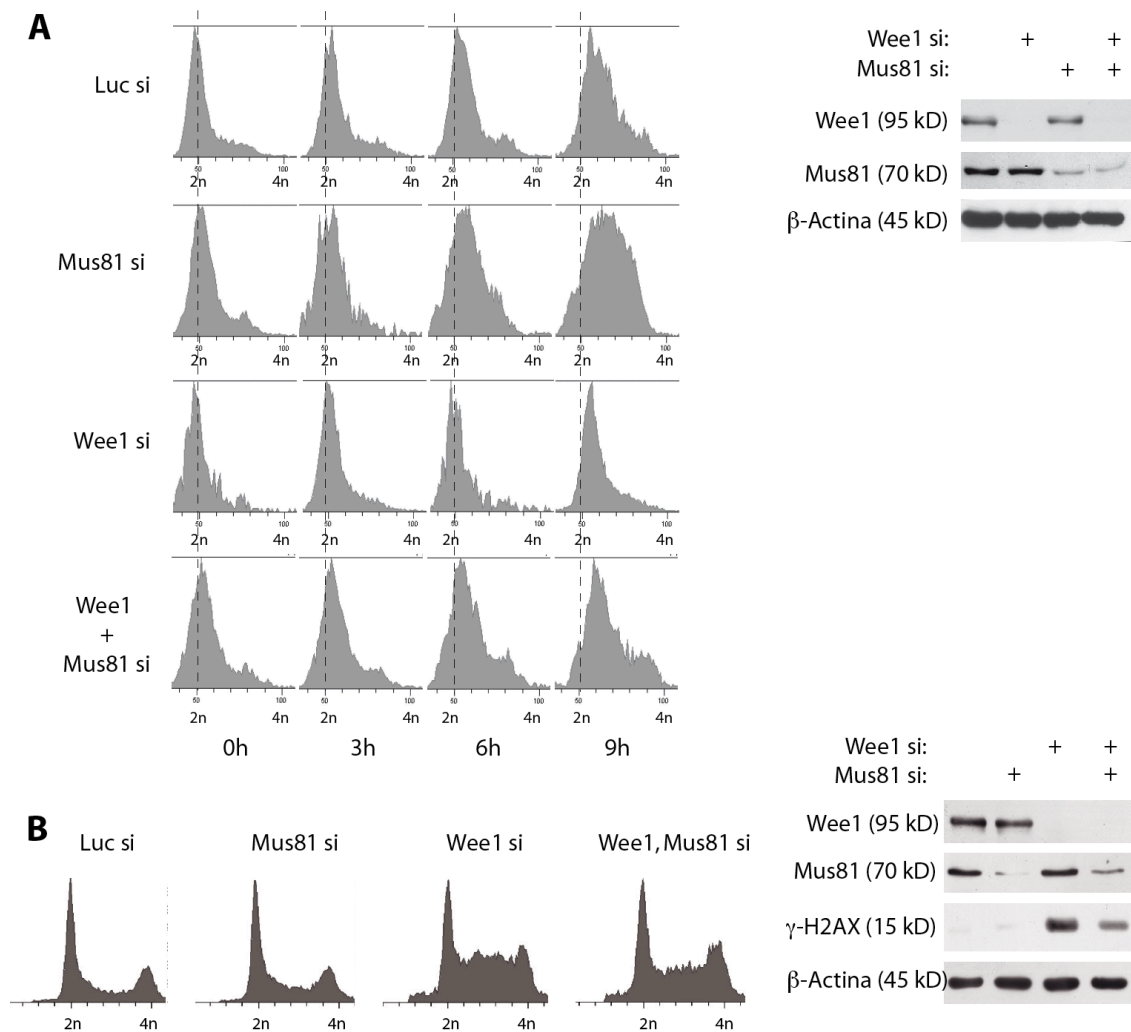


**Figura 25: La eliminación de Mus81 revierte el daño en ausencia de Wee1, pero no de MCM4, y restaura la unión de ésta a cromatina.** (A) Células U2OS fueron transfectadas con siRNA contra Luciferasa y MCM4 durante 72 horas y/o siRNA contra Mus81 en presencia de timidina durante las últimas 24 horas. Después, los extractos celulares totales fueron analizados con los anticuerpos indicados. (B) Células U2OS fueron transfectadas con siRNA contra Luciferasa o Mus81 por 48 horas en presencia de timidina. Durante las últimas 24 horas, se transfectaron de nuevo, con siRNA contra

Luciferasa o Wee1. Posteriormente, las células fueron liberadas del arresto por 3 horas antes de realizar el tratamiento con detergente, previo a la fijación, y analizadas por inmunofluorescencia con los anticuerpos indicados. Barras, 10  $\mu\text{m}$ .

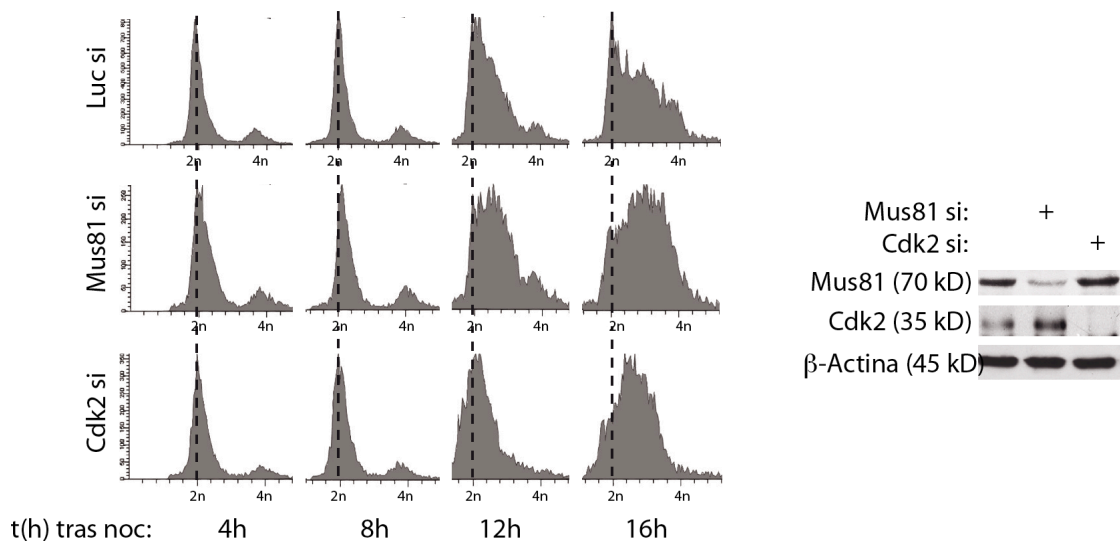
### ***11. La eliminación conjunta de Wee1 y Mus81 restaura la progresión normal durante la fase S***

Basándonos en los resultados descritos hasta ahora, especulamos sobre si Mus81 podría tener también un papel central y directo en otros aspectos del fenotipo observado en ausencia de Wee1, como el retraso de la fase S (Figura 10). Para averiguarlo, estudiamos la progresión de células sincronizadas en fase S en condiciones de ausencia de Wee1 o de Wee1 y Mus81. Como pudimos observar y en concordancia con experimentos previos, células carentes de Wee1 mostraban una pronunciada inhibición en su progresión a través de fase S (Figura 26A). Sin embargo, la eliminación simultánea de Wee1 y Mus81 devolvía a las células una progresión similar a la observada con células tratadas con siRNA control. Este efecto lo pudimos detectar parcialmente también en células asincrónicas, en donde la eliminación simultánea de Wee1 y Mus81 reduce parcialmente el número de células en fase S observado en ausencia de Wee1 (Figura 26B).



**Figura 26: La falta de Mus81 restaura el defecto en la progresión durante la fase S en células sin Wee1.** (A) Células U2OS fueron transfectadas con siRNA contra Luciferasa y Mus81 durante 48 horas y/o con siRNA contra Wee1 durante las últimas 24 horas, todo ello en presencia de timidina. Las células fueron posteriormente liberadas del arresto y se estudió en contenido en ADN a los tiempos indicados mediante citometría de flujo. También se muestra el análisis por *Western blot* con los anticuerpos indicados y a tiempo 0 horas tras la liberación. Las líneas de puntos indican la posición del pico G1 a tiempo 0 horas. (B) Se transfectaron células U2OS con siRNA contra Mus81 y, 24 horas después, con siRNA contra Wee1 donde se indica. 48 horas más tarde, las células fueron recogidas para su análisis por citometría de flujo mediante tinción con yoduro de propidio o para *Western blot* con los anticuerpos indicados.

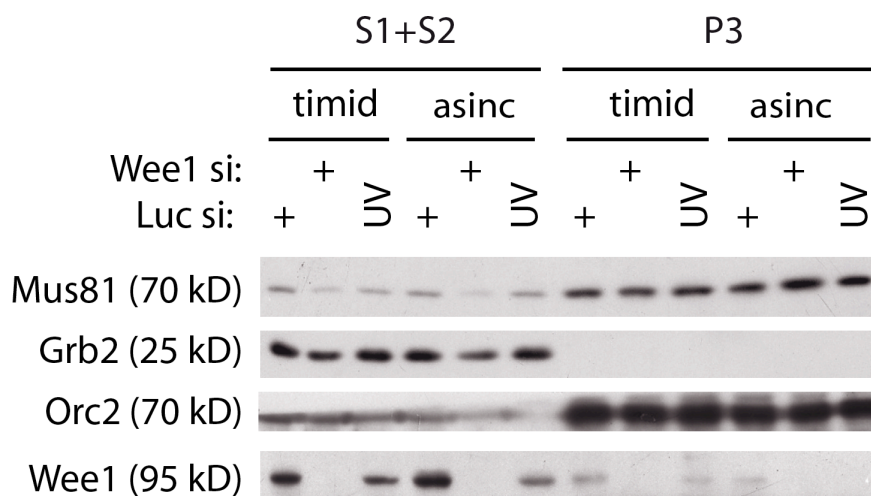
Dado que la activación de la respuesta a daño en ausencia de Wee1 tiene lugar en fase S, quisimos asegurarnos de que el rescate producido por la eliminación de Mus81 en ausencia de Wee1 no se debía a un efecto indirecto y que las células no estuvieran entrando en fase S. Para ello, estudiamos la progresión de células sin Mus81 y confirmamos que estas células eran capaces de entrar y progresar a través de la fase S de forma similar a células control (Figura 27). La otra proteína cuya supresión demostró ser capaz de rescatar este defecto en ausencia de Wee1 fue Cdk2. De manera similar al caso de Mus81, observamos que células carentes de Cdk2 eran capaces de progresar durante la fase S de manera normal, por lo que tampoco en este caso podemos atribuir el rescate a un efecto indirecto de alteración del ciclo celular (Figura 27).



**Figura 27: La ausencia de Mus81 no tiene ningún efecto en la entrada en fase S.** Células U2OS fueron transfectadas con siRNA contra Mus81 o Cdk2 y al mismo tiempo se añadió timidina. Tras 48 horas, las células fueron lavadas de la timidina y 8 horas más tarde se añadió nocodazol. 16 horas después se eliminó el nocodazol y las células fueron recogidas a los tiempos indicados. Los perfiles de ciclo celular fueron determinados mediante citometría de flujo usando yoduro de propidio. Las líneas de puntos indican la posición del pico de G1 4 horas después de la liberación del nocodazol.

## 12. La ausencia de Wee1 no afecta la unión de Mus81 a la cromatina

Como hemos mencionado anteriormente, se ha descrito el papel de la quinasa del *checkpoint* en *S.pombe*, Cds1, en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Boddy et al., 2000; Kai et al., 2005). En condiciones de estrés replicativo, esta quinasa fosforila a Mus81 regulando negativamente su asociación a cromatina y, por tanto, su actividad (Kai et al., 2005). Teniendo esto en cuenta y para intentar definir el mecanismo por el que esta endonucleasa se encuentra envuelta en la generación de daño en el ADN en ausencia de Wee1, empezamos estudiando si los niveles de Mus81 unida a cromatina se veían afectados en estas condiciones. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en la asociación de Mus81 a cromatina en presencia o ausencia de Wee1 por fraccionamiento bioquímico (Figura 28), tanto en células asincrónicas como en células sincronizadas en fase S, contradiciendo la hipótesis de que Wee1 pudiera estar controlando la actividad de Mus81 de esta manera.

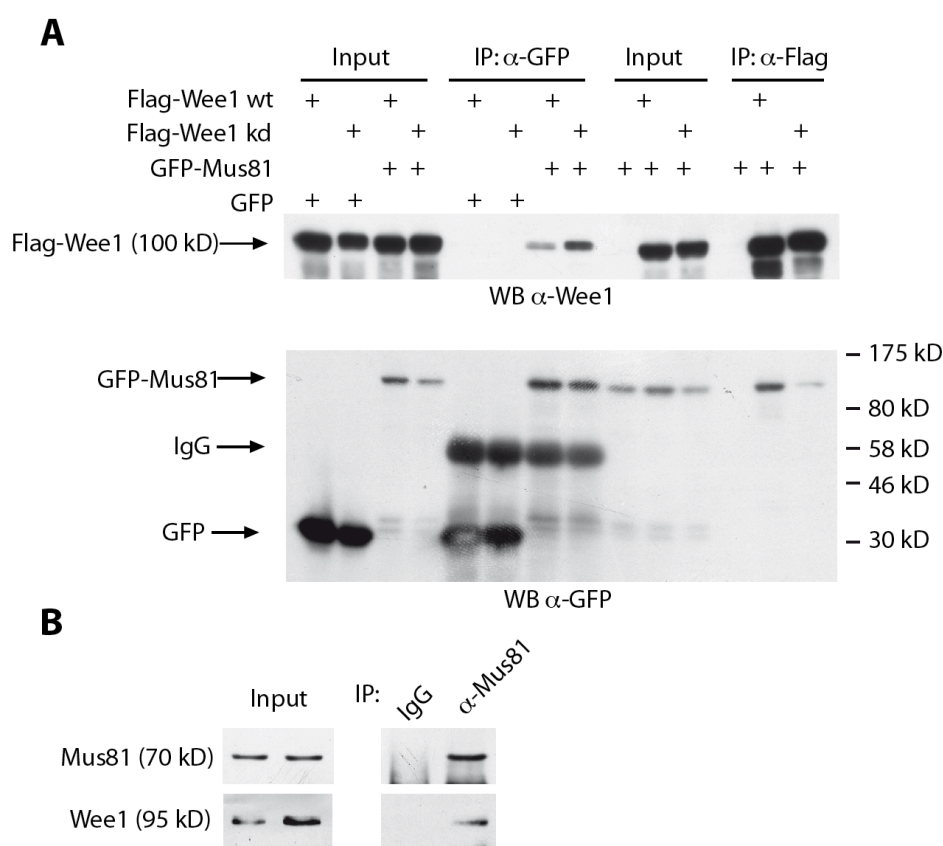


**Figura 28: La eliminación de Wee1 no afecta la unión de Mus81 a cromatina.** Fraccionamiento de la cromatina de células transfectadas con siRNA contra Luciferasa o Wee1 durante 24 horas. Como control de daño se utilizaron células tratadas con radiación UV (40 J/M<sup>2</sup> por 1 hora). Las células fueron arrestadas con timidina por 24 horas o mantenidas en asincronía. P3, fracción de cromatina. S1 + S2, proteínas solubles.



### 13. Wee1 interacciona con Mus81

Para seguir definiendo la relación entre Wee1 y Mus81, estudiamos si existía un vínculo directo entre estas dos proteínas. Para ello, realizamos experimentos de inmunoprecipitación tanto en células con expresión exógena de ambas proteínas, como con su forma endógena. Al sobreexpresar Flag-Wee1 y GFP-Mus81 observamos una clara interacción de las dos al inmunoprecipitar contra Flag o contra GFP (Figura 29A). Estos experimentos los realizamos tanto con la forma silvestre de Wee1 como con una versión catalíticamente inactiva de ella, y no observamos diferencias reproducibles en la interacción con Mus81, lo que indica que, probablemente, la interacción se realiza a través de una región distinta al centro activo de Wee1. También pudimos detectar esta interacción mediante inmunoprecipitación de Mus81 endógena (Figura 29B). Por todo ello, estos resultados apuntan hacia un inesperado y nuevo papel de Wee1 como reguladora de Mus81 durante la fase S.



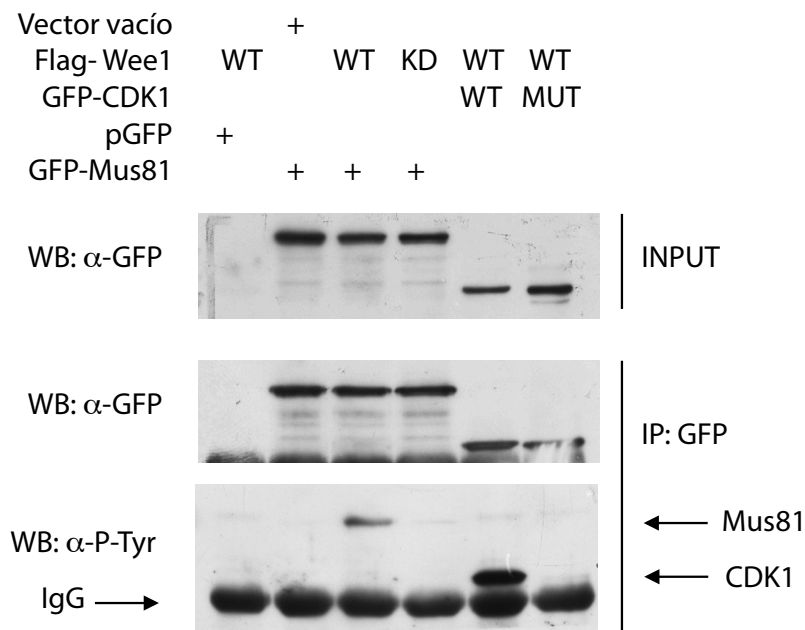
**Figura 29: Wee1 y Mus81 interaccionan.** (A) Células HEK 293T fueron cotransfectadas con las combinaciones indicadas de plásmidos,

incluyendo vectores de expresión para las versiones silvestre y catalíticamente inactiva (kd) de Flag-Wee1, GFP y GFP-Mus81, y se realizaron inmunoprecipitaciones (IP) empleando anticuerpos anti-GFP o anti-Flag. Los *inputs* e inmunoprecipitados fueron analizados con anticuerpos anti-Wee1 y anti-GFP. (B) Los inmunoprecipitados de Mus81 endógena de U2OS fueron analizados mediante *Western blot* con los anticuerpos que se señalan.

#### ***14. Wee1 fosforila a Mus81***

La interacción entre Wee1 y Mus81 nos hizo pensar en una posible regulación funcional de Wee1 sobre Mus81. Dado que Wee1 es una proteína-quinasa, investigamos si estaba fosforilando a Mus81 *in vivo*. Para ello, primero purificamos Mus81 en células que coexpresaban Wee1 en su forma silvestre o catalíticamente inactiva y estudiamos su fosforilación con un anticuerpo específicos anti-fosfo-tirosina. Como control positivo, utilizamos a una versión silvestre y un mutante para la treonina 14 y tirosina 15 de Cdk1, cuya fosforilación por Wee1 se encuentra bien caracterizada (Lundgren et al., 1991; Russell & Nurse, 1987; Watanabe et al., 1995).

Efectivamente, la proteína Mus81 aparecía fosforilada en tirosina únicamente cuando se coexpresaba con la forma silvestre de Wee1, con unos niveles de fosforilación equivalentes a los de Cdk1 silvestre, indicando que Mus81 puede ser sustrato de Wee1 (Figura 30).



**Figura 30: Wee1 fosforila a Mus81 cuando se sobreexpresan ambas proteínas.** Células HEK 293T fueron transfectadas con plásmidos para la expresión de Flag-Wee1 en su versión silvestre y catalíticamente inactiva, GFP, GFP-Mus81, un vector vacío y GFP-Cdk1 silvestre o un mutante que no puede ser fosforilado por Wee1 (T14A, Y15F) como controles. 36 horas después de la transfección se realizaron inmunoprecipitaciones con anticuerpos anti-GFP. Los *inputs* fueron analizados con anticuerpos anti-GFP y los inmunoprecipitados con anti-GFP y anti-fosfo-tirosina.

### ***15. La tirosina 130 de Mus81 está fosforilada por Wee1***

A continuación, para identificar la o las posiciones concretas fosforiladas por Wee1, pensamos realizar el mismo tipo de experimento que se muestra en la figura 30, pero con mutantes puntuales en las distintas tirosinas de Mus81. Con el fin de seleccionar previamente las tirosinas candidatas a mutar, estudiamos qué residuos estaban conservados a lo largo de la evolución en esta proteína (Figura 31).

```

H. sapiens      MAAPVRLGRKRPLPACPNPLFVRWLTEWRDEATRSMRRTRFVFOKALRSLRRYPLPLRSG 60
M. musculus    MAEPVRLGRKRPLPVCNPLFVRWLTEWRDEAASRGRHTRFVFOKALRSLQRYPLPLRSG 60
X. laevis      MPGEITYGRKRPLPACPNPLFLKWLTEWRDSAAEKNLKTQFVYQKAISLKKYPLPLNSG 60
* . : * * * * * . * * * * * : * * * * * . * : * * * * * : * * : * * * * *

H. sapiens      KEAKILQHFQDGLCRMLDERLQRHRTSGG-----DHAPDPSGGENSP 102
M. musculus    KEAKILQHFQDRLCRMLDEKLRHLASGG-----DHAPSSPSGKKG- 101
xenopus        KEAKILQNFQDSICKMLDDRLEKHYAECGNPIIHTVPSSSSTLRKAQRQPKAPSPLSIP 120
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

H. sapiens      APQGRLAEVQDSSMPVPAQPKAGSGS-YWPARHSGARVILLVLYREHLNPNNGHHFLTKE 161
M. musculus    ASKGPPEQVQDSSMPVPTQPOAGSTSVGYWPAQNSGAREILLQLYREHLNSDGHGFLTKE 161
X. laevis      HALEPPEQESQDLSPSKTKTGGKKQREYVPQRSSGGYAVLLTLYRDTKSPSSRGYMTKA 180
. : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

H. sapiens      ELLQR----CAQKSPRVAPGS-ARPPALRSLLRNLVLRTHQPARVSLTPEGLELAQKL 216
M. musculus    ELLQK----CAQKTRPVVPGS-SKPWPALRSLLRNLVLRTHQPARVSLTPEGLELAQKL 216
X. laevis      ELQKEAQLCDKSFSLTDPNSKYTAWTSVSTLIQKELVIKTHSPARVSLTEKGLELAQRL 240
* * : . * : . . . * . * . * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

H. sapiens      AESE-----GLSLLNVGIGPKEPPGEET-----AVPGAASAE 248
M. musculus    AEAE-----GLSTRHAGFRPEEHHGDS-----AVPEALSEP 248
X. laevis      EEAEQGRADGFPRQVQASSNEEEQEEAESETNPYIHADPVQCPDQQLNLAYSHNAKNT 300
* : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

H. sapiens      LASEAGVQO---QPLELRPGEYRVLLCVDIGETRG-GGHR-PELLRELQRLHVHTVTRKL 303
M. musculus    GTTEGAVQO---RPLELRPSEYRVLLCVDIGETRG-AGHR-PEMLRELQRLRVPHVTRKL 303
X. laevis      SSDPPSVQYNHVPEFTLHPGDFNILLCVDFIETTGGAAHRKQELVTELRNRGVNFDVRKL 360
: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

H. sapiens      HVGDFVWVAQETNPRDP-----ANPGEVLVDHIVERKRLDDLCSIIIDGRFREQKFRLLKR 358
M. musculus    HVGDFVWVAQETRPRDP-----ERPGEVLVDHIVERKRLDDLCSIIIDGRFREQKFRLLKR 358
X. laevis      HIGDFLWIAQEKVQVPVPGQLRIPQARELVLDYVVERKRMDDLCSIIIDGRFREQKFRLLKR 420
* : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

H. sapiens      CGLERRVYLVEEHGSVHNLSLPESTLLQAVTNTQVIDGFFVKRTADIKESAAYLALLTRG 418
M. musculus    CGLGHRVYLVEEHGSVHNLSLPESTLLQAVTNTQVIDGFFVKRTMDIKESAGYLALLTKG 418
X. laevis      CGLRRPIYLVEDHGSAQHLSIPETTLQQAIVNTQVVDGFFIKRTKDVRESAAYLTIMTRY 480
* * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

H. sapiens      LQRLYQGHTLRSRPWGTPGNPESGAMTSPNPLCSLLTFSDFNAGAIKNAQSVREVFARQ 478
M. musculus    LERLYQGHTLRSRPWGAPGAAESEAKPSTNPLCSLLTFSDFNAEAVKNAQSVREVFARQ 478
X. laevis      LQGIYSRKSLLSCTKEEAWKCDRLRPDAS-SCILVEFKDFNEGAMKNAQTVEVFARQ 539
* : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

H. sapiens      LMQVRGVSGEKAAALVDRYSTPASLLAAYDACATPKEQETLLSTIKCGRQLQRNLGPALSR 538
M. musculus    LMQVRGLSGEKAAAVDRYSTPASLLAAYDACATAKEQEMLLSTIKCGRQLQRNLGPALSR 538
X. laevis      LMQISGVSGEKAALILEKYSTPASLMSAYESSSAEKEKLLSSVKCGKQLQRNLGPVLSK 599
* * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

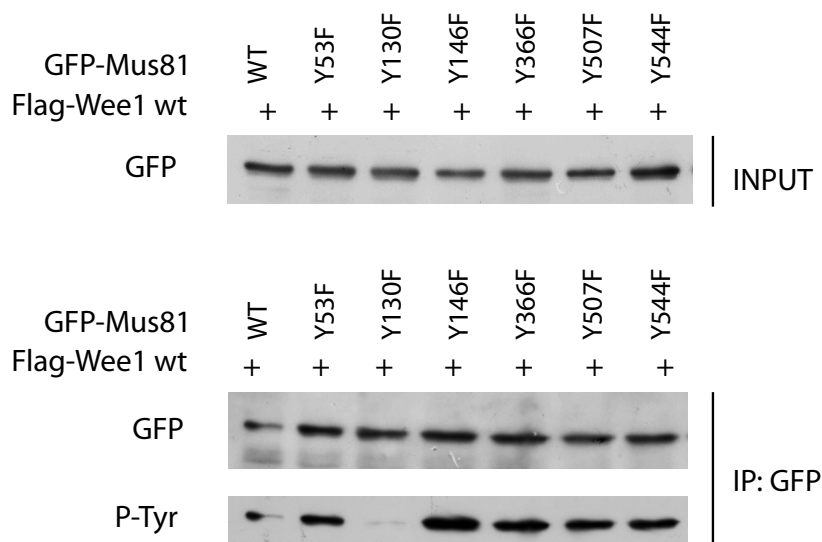
H. sapiens      TLSQLYCSYGPLT 551
M. musculus    TLYQLYCSHSPLS 551
X. laevis      TISQLYCTKEPLS 612
* : * * * * * : * * * * *

```

**Figura 31: Alineamiento de secuencias de Mus81 en distintos organismos.** En negrita se muestran las tirosinas conservadas a lo largo de la evolución y en amarillo, las posiciones para las que se generaron mutantes simples.

Luego, creamos mutantes simples sustituyendo distintas tirosinas conservadas de Mus81 por fenilalaninas (Y53F, Y130F, Y146F, Y366F, Y507F, Y544F) y estudiamos la fosforilación de esos mutantes por

*Western blot* con anticuerpos contra fosfo-tirosina, en condiciones de sobreexpresión de Wee1. Así, pudimos observar que la fosforilación de Mus81 desaparecía en el mutante para la tirosina 130, lo que sugiere que Wee1 está fosforilando a Mus81 en esta posición (Figura 32).



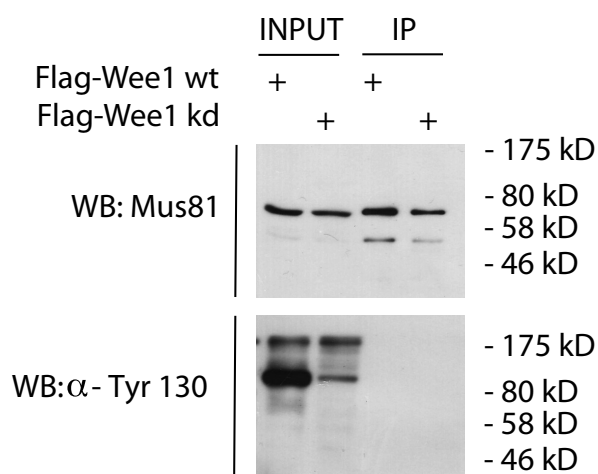
**Figura 32: Wee1 fosforila a la tirosina 130 de Mus81.** Se transfectaron células HEK 293T con plásmidos para la expresión de Flag-Wee1 en su versión silvestre, y las versiones silvestre y mutantes para las tirosinas de Mus81 fusionados a GFP. Se realizaron inmunoprecipitaciones empleando anticuerpos anti-GFP. Los *inputs* fueron analizados con anticuerpos anti-GFP y los inmunoprecipitados con anti-GFP y anti-fosfo-tirosina.

El siguiente paso que dimos fue intentar demostrar que esta fosforilación ocurría *in vivo*. Para ello, encargamos a una compañía (Genescript) la fabricación de un anticuerpo fosfo-específico contra esta posición fosforilada y probamos su especificidad de la misma manera que en los experimentos anteriores. El anticuerpo parecía funcionar con proteínas sobreexpresadas (Figura 33) de manera similar al anticuerpo anti-fosfo tirosina total (Figuras 30 y 32).



**Figura 33: El anticuerpo anti-fosfo-tirosina 130 reconoce la fosforilación de Mus81 por Wee1 silvestre al sobreexpresar ambas proteínas.** Se transfectaron células HEK 293T con plásmidos para la expresión de Flag-Wee1 en su versión silvestre y catalíticamente inactiva, según se indica, junto con la versión silvestre de Mus81 fusionada a GFP. Se realizaron inmunoprecipitaciones empleando anticuerpos anti-GFP. Los *inputs* e inmunoprecipitados fueron analizados con anticuerpos anti-Mus81 y anti-fosfo-tirosina 130.

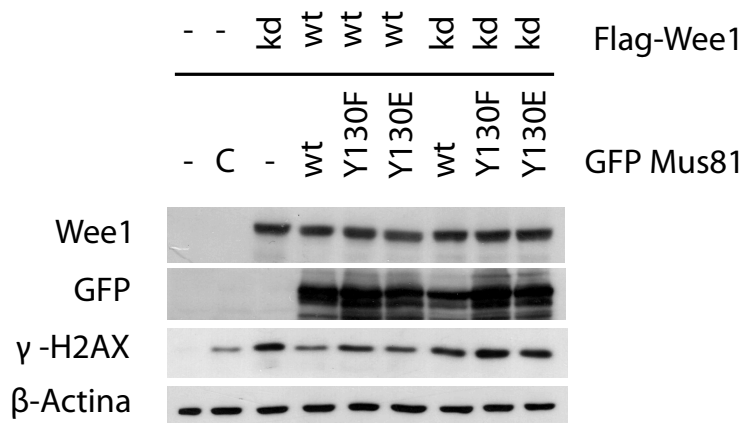
Para comprobar si el anticuerpo funcionaba *in vivo* contra la proteína endógena, realizamos ensayos de inmunoprecipitación de Mus81 en condiciones desnaturalizantes y análisis por *Western blot* con el anticuerpo fosfo-específico. En estas condiciones, no nos fue posible demostrar que Mus81 estuviera fosforilada en esta posición (Figura 34).



**Figura 34: No es posible detectar la fosforilación de la proteína Mus81 endógena por Wee1 utilizando el anticuerpo anti-fosfo-tirosina 130.** Células HEK 293T fueron transfectadas con plásmidos para la expresión de Flag-Wee1 en su versión silvestre y catalíticamente inactiva. 36 horas después de la transfección se realizaron inmunoprecipitaciones con anticuerpos anti-Mu81. Los *inputs* e inmunoprecipitados fueron analizados con anticuerpos anti-Mus81 y anti-fosfo-tirosina 130.

## 16. Los mutantes *Mus81 Y130F* y *Y130E* se comportan como la proteína silvestre *in vitro* e *in vivo*

Además, con el fin de determinar la relevancia de la fosforilación de *Mus81* por *Wee1* en su tirosina 130, generamos dos mutantes simples: uno en el que sustituimos esta tirosina por un residuo de fenilalanina, el cual no puede ser fosforilado por *Wee1*, y otro en el que lo sustituimos por ácido glutámico, que mimetiza a un residuo fosforilado. Como pudimos ver por *Western blot* (Figura 35), no existen diferencias en la inducción de daño en células que expresan cualquiera de los dos mutantes, en comparación con la versión silvestre de *Mus81*, por lo que, en principio, parece que el estado de fosforilación de esta posición no es relevante en la inducción de daño.



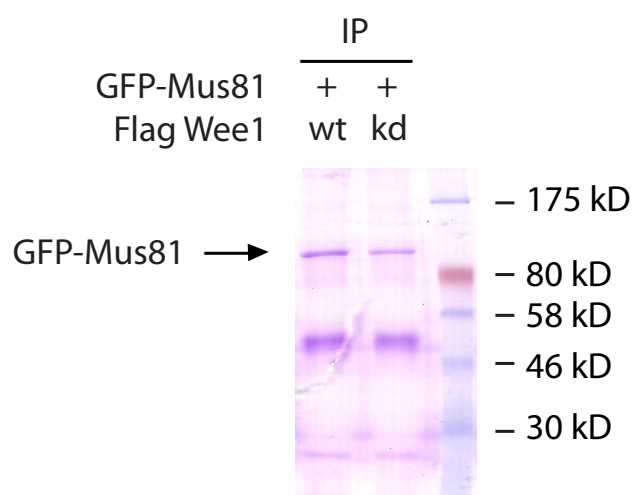
**Figura 35: La mutación de la tirosina 130 de *Mus81* no tiene un efecto sobre la inducción de daño.** Se transfectaron células HEK 293T con plásmidos para la expresión de Flag-Wee1 en su versión silvestre o catalíticamente inactiva, y la versión silvestre o mutantes para la tirosina 130 de *Mus81*, con una etiqueta GFP. Posteriormente se analizó la fosforilación de H2AX mediante *Western blot*. Como controles, se analizaron extractos de células sin transfectar (-) y células transfectadas con un vector vacío (C).

Estos resultados, junto con la imposibilidad de observar la fosforilación de la posición 130 de *Mus81* por *Wee1* en la proteína endógena, nos hicieron plantearnos si se trataría de un efecto real o, al menos, si tendría algún significado funcional en este contexto. Por ello, decidimos seguir

investigando la fosforilación de Mus81 por Wee1, en otras posiciones y mediante técnicas distintas.

### ***17. Mus81 está fosforilada en la tirosina 423 y la serina 541***

Para tratar de identificar otros posibles residuos que pudieran ser diana para la fosforilación por Wee1, decidimos llevar a cabo una aproximación proteómica. De este modo, sobreexpresamos Mus81 junto con Wee1 silvestre o el mutante inactivo (Figura 36), inmunoprecipitamos Mus81 y estudiamos, por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (modelo LTQ-Orbitrap), las posiciones fosforiladas en cada caso. Mediante esta técnica identificamos, además de la tirosina 130, dos nuevos residuos de Mus81 que aparecían fosforilados solamente al coexpresar Wee1 silvestre: la tirosina 423, residuo conservado (Figura 31) y la serina 541, de manera que, aunque se trata de experimentos preliminares que requieren confirmación, se abre un nuevo abanico de posibilidades a estudiar para describir el tipo de regulación que existe entre estas proteínas.

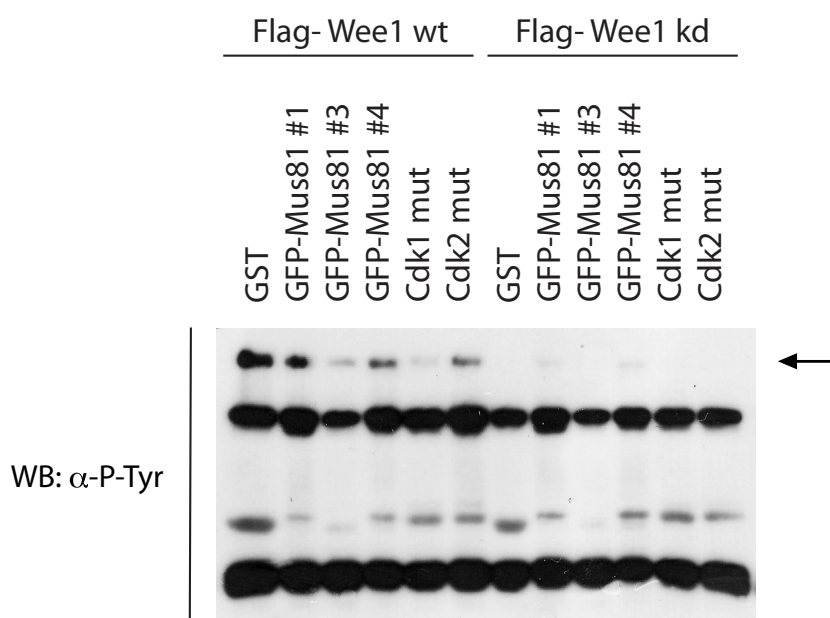


**Figura 36: Purificación de la proteína GFP-Mus81 para su análisis proteómico.** Se transfectaron células HEK 293T con plásmidos para la expresión de GFP-Mus81 y de Flag-Wee1 en su versión silvestre y catalíticamente inactiva. 36 horas después de la transfección se realizaron inmunoprecipitaciones con anticuerpos anti-GFP y se sometieron los inmunoprecipitados a análisis proteómico. Se muestra el análisis preliminar de las muestras, mediante electroforesis y tinción con azul de Coomassie.



## 18. Wee1 puede ser capaz de regular su propia actividad mediante autofosforilación

En otra rama de nuestro estudio, llevamos a cabo ensayos de actividad quinasa *in vitro* con proteínas purificadas de células en cultivo. Nuestro objetivo era demostrar la fosforilación de Mus81 por la versión silvestre de Wee1, y no por la catalíticamente inactiva. Sin embargo, no conseguimos optimizar el ensayo lo suficiente como para poder ver este fenómeno. No obstante, en estos ensayos observamos, casi por casualidad, una cierta actividad de autofosforilación de Wee1 silvestre que desaparecía en el mutante inactivo, lo que nos hizo pensar en una posible autorregulación de la actividad de esta proteína (Figura 37).



**Figura 37: Ensayo quinasa *in vitro*.** Se expresaron y purificaron en bacterias diferentes fragmentos de Mus81 marcados con una etiqueta GST (sustrato), y las versiones silvestre y catalíticamente inactiva de Flag-Wee1 (quinasa) en células 293T. Se realizó el ensayo quinasa-*in vitro* y se analizó el resultado por *Western blot* con un anticuerpo específico anti-fosfo-tirosina. La flecha indica una banda correspondiente al peso molecular de Flag-Wee1 (100kD). Mutantes para Cdk1 y Cdk2 fueron empleados como controles en el ensayo quinasa.

Para estudiar este efecto, sobreexpresamos y purificamos Wee1 silvestre o catalíticamente inactiva en células humanas para, posteriormente, analizar por técnicas proteómicas todas las posiciones diferencialmente fosforiladas en cada una de las proteínas. Los residuos fosforilados en Wee1 silvestre, pero no en la proteína inactiva, son candidatos a ser autofosforilaciones. Los resultados indicaron varios residuos fosforilados en la proteína silvestre que no aparecían en la mutante (Y295, S337, Y492), los cuales son, además, posiciones conservadas de Wee1. Estas observaciones concuerdan con nuestra hipótesis de autofosforilación (Figura 38).

Sorprendentemente, también identificamos varias posiciones que, por el contrario, sólo aparecían fosforiladas en la versión mutante (Y416, S419 y S421; ver figura 38), sugiriendo que, aparte de autorregularse, Wee1 podría estar controlada externamente por proteínas que, a su vez, ella misma controla. Esto explicaría una mayor fosforilación del mutante inactivo, ya que, en este caso, estos reguladores tendrían una mayor actividad al no estar sometidos a fosforilación inhibitoria.



## IV. DISCUSIÓN

### *1. Búsqueda de nuevas quinasas implicadas en el mantenimiento de la estabilidad genómica*

Existen multitud de agentes, externos e internos, que pueden amenazar la integridad del genoma. La llamada respuesta a daño en el ADN engloba la red de mecanismos destinados a evitar la transmisión de estas lesiones a las células hijas. Con el fin de identificar nuevas quinasas implicadas en estos procesos, diseñamos un rastreo tomando la fosforilación de la histona H2AX ( $\gamma$ -H2AX) como lectura, ya que se trata de un indicador universal de la activación de esta respuesta.

Obtuvimos dos claros resultados: por un lado, la eliminación de Chk1 causaba una fuerte inducción de  $\gamma$ -H2AX, confirmando la fiabilidad de nuestro estudio al tratarse de una conocida quinasa implicada en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Además, obtuvimos un llamativo resultado: la falta de la quinasa Wee1 provocaba la inducción de la fosforilación de la histona. Hasta ahora, Wee1 únicamente había sido relacionada con el control del ciclo celular mediante fosforilación inhibitoria de quinasas dependientes de ciclina (Cdks) (Parker & Piwnicka-Worms, 1992), por lo que decidimos centrar nuestro estudio en esta interesante candidata.

Pudimos comprobar que la ausencia de Wee1 causaba una activación general de la respuesta a daño en el ADN, tanto por la vía de ATM como por la de ATR (Figura 4). Esto resulta interesante, puesto que en otros casos como, por ejemplo, en el de Chk1, su inhibición o eliminación induce una respuesta a daño que depende de ATR, pero no de ATM (Syljuasen et al., 2005). De este modo, nuestros resultados apuntan a que en ausencia de Wee1 se producen lesiones complejas que incluyen roturas de cadena sencilla y de la doble hebra del ADN.

Además, la activación de esta respuesta fue observada exclusivamente en células en fase S del ciclo celular (Figura 10), junto con una acentuada ralentización de la horquilla de replicación (Figura 15), resultados que apuntan hacia un papel de Wee1 en replicación y sitúan, por primera vez, a

esta quinasa fuera del contexto del control de Cdks y, en concreto, de la transición G2/M.

## ***2. Wee1 y Chk1 intervienen en el mantenimiento de la estabilidad genómica mediante vías distintas***

Chk1 es una proteína esencial en el *checkpoint* celular en respuesta a daño y en el control de una fase S normal. Se ha demostrado que su inhibición o eliminación es suficiente para generar la activación de una respuesta a daño dependiente de ATR durante la fase S, la formación masiva de roturas en el ADN, además de causar problemas en la replicación (Beck et al., 2010; Petermann et al., 2006; Syljuasen et al., 2005).

Chk1 es un regulador negativo de Cdc25 en un ciclo celular normal (Sørensen, Syljuåsen, Lukas, & Bartek, 2004), y en concordancia, ha sido descrito que la ausencia de Chk1 causa una activación excesiva de Cdc25 que, a su vez, provoca la hiperactivación de Cdk2. Esto conduciría a la activación descontrolada de orígenes de replicación latentes (Shechter, Costanzo, & Gautier, 2004; Syljuasen et al., 2005), generando una cantidad anormal de regiones monocatenarias de ADN que, al ser cubiertas por RPA, conducirían a la activación de la vía de ATR (Syljuasen et al., 2005). Se ha sugerido que esta iniciación anormal de la replicación en ausencia de Chk1 puede dar lugar a estructuras aberrantes en el ADN que causen el bloqueo y consecuente descenso en la velocidad de progresión de las horquillas de replicación y, finalmente, su colapso (Maya-Mendoza et al., 2007; Petermann et al., 2006; Scrah & McGowan, 2009).

En nuestros estudios descubrimos que la eliminación de Wee1, además de un fenotipo similar, con inducción de la respuesta a daño y ralentización de la horquilla de replicación, también causa un descenso en los niveles de Chk1. Sin embargo, este efecto no parece ser la causa de los defectos observados en ausencia de Wee1, ya que la restauración de los niveles de Chk1 en estas condiciones no fue capaz de revertir este fenotipo (Figura 11).

Chk1 es, además, un conocido activador de Wee1 en el *checkpoint* G2/M

mediante su fosforilación (J. Lee et al., 2001), por lo que cabría pensar que, también en el contexto de la replicación, ambas proteínas se encontraran formando parte de la misma vía. No obstante, a través de estudios de citometría y midiendo la velocidad de la horquilla de replicación, pudimos comprobar que la eliminación de ambas proteínas posee un efecto aditivo respecto a la eliminación individual (Figura 19), lo que sugiere que ambas proteínas poseen funciones similares en el control de la replicación, pero pertenecen a vías distintas.

El descubrimiento de una nueva vía mediante la cual la célula asegura la integridad de la replicación de su material genético resulta muy interesante, ya que evidencia, una vez más, la importancia de este proceso en el mantenimiento de la estabilidad genómica y cómo éste constituye un punto especialmente vulnerable del ciclo celular que podría ser utilizado como diana para atacar selectivamente a las células cancerígenas.

### ***3. Implicación de Cdk2 y Mus81 en el fenotipo generado en ausencia de Wee1***

#### *3.1 Wee1 y Cdk2*

A pesar de que el papel más conocido de Wee1 hasta ahora es el de regulador negativo de la transición G2/M mediante la fosforilación inhibitoria de Cdk1, la relación de regulación entre Wee1 y Cdk2 también ha sido descrita (ver apartado *Wee1 y Cdk2* en el capítulo *Introducción*). En nuestros experimentos pudimos observar que, durante fase S, Wee1 parece fosforilar tanto a Cdk1 como a Cdk2 aunque solamente esta última parece estar implicada en el papel de Wee1 en el mantenimiento de la estabilidad genómica, ya que la eliminación de las dos proteínas no induce la fosforilación de la histona H2AX (Figura 13).

Estos resultados contrastan con un estudio reciente y relacionado con nuestros datos en el que se identifica a Wee1 y Chk1 como implicados en la inestabilidad genómica (Beck et al., 2010). En este trabajo en el que se comenta que la ausencia de Wee1 provoca daño en el ADN, se indica que este efecto es rescatado por inhibición tanto de Cdk1 como de Cdk2 (Beck

et al., 2010). Estos resultados podrían explicarse por las diferencias en la metodología empleada, ya que, en nuestro caso, estos experimentos fueron realizados con células sincronizadas en fase S para evitar estudiar efectos indirectos en fase G2/M, mientras que en el mencionado trabajo se emplearon células asincrónicas.

Como mencionamos en el apartado anterior, publicaciones previas relacionan el fenotipo observado tras la eliminación o inhibición de Chk1 con una desregulación de Cdk2, causada por el exceso de actividad de Cdc25 (Mailand et al., 2000; Scolah & McGowan, 2009) en ausencia de Chk1. Es posible que éste sea el caso también en ausencia de Wee1, dado que la eliminación de Cdk2 revierte el fenotipo observado. En cualquier caso, nos planteamos la posibilidad de que este rescate se debiera a que la ausencia de Cdk2 en las células previniera su entrada en fase S. Sin embargo y para nuestra sorpresa, estas células podían entrar en esta fase del ciclo celular de manera comparable a células control (Figura 27). Esto puede ser explicado porque, como ha sido descrito, en ausencia de Cdk2, Cdk1 puede suplir su función para promover la entrada en S (Aleem, Kiyokawa, & Kaldis, 2005; Ortega et al., 2003).

### 3.2 *Wee1* y *Mus81*

La implicación de ciertas endonucleasas en procesos de reparación y estabilización de horquillas de replicación bloqueadas está bien documentada (Hanada et al., 2007; Kogoma, 1997; Segurado & Diffley, 2008). Concretamente, la endonucleasa heterodimérica Mus81-Eme1 ha sido relacionada con la formación de cortes de la doble hebra del ADN como parte de procesos de reparación mediante recombinación homóloga, favoreciendo la reanudación de las horquillas bloqueadas y previniendo la generación de aberraciones cromosómicas (Hanada et al., 2007).

Además, en *S. pombe* se ha descrito la regulación de Mus81 en fase S por Cds1 (Kai et al., 2005) (ortólogo funcional de Chk1 en humanos por su papel en el control del *checkpoint* de replicación) mediante el control de su fosforilación y, consecuentemente, de su unión a cromatina (Kai et al., 2005). No obstante, en humanos no se han podido observar cambios en la

asociación de Mus81 a cromatina en ausencia de Chk1, por lo que se cree que, en este caso, el nivel de regulación podría encontrarse en la asociación de la endonucleasa a otras proteínas (Forment, Blasius, Guerini, & Jackson, 2011).

Estos trabajos sugieren la desregulación de la actividad de Mus81 como responsable de la formación de roturas del ADN en ausencia de Chk1, que podrían conllevar a los defectos en la replicación observados en estas células (Forment et al., 2011). Por todos estos datos y dada la similitud entre el fenotipo observado en ausencia de Chk1 y el que describimos en nuestro trabajo por la falta de Wee1, investigamos la posible implicación de Mus81-Eme1 también en este caso, comprobando que, efectivamente, esta endonucleasa está relacionada con la activación de la respuesta a daño y los defectos en la progresión de la horquilla en ausencia de Wee1, pues su eliminación devuelve a las células un fenotipo normal (Figura 26).

### 3.3 *Wee1, Mus81 y Cdk2*

Tomando todos estos estudios en conjunto con nuestros resultados, sugerimos dos posibles hipótesis:

En una primera hipótesis cabría pensar que el fenotipo observado en ausencia de Wee1 pudiera estar relacionado con una desregulación de Cdk2, como fue descrito en ausencia de Chk1 (Mailand et al., 2000; Scora & McGowan, 2009). De este modo, la falta de control de Wee1 sobre Cdk2 provocaría una excesiva iniciación de la replicación y la formación de estructuras aberrantes del ADN, susceptibles a ser cortadas por esta endonucleasa.

No obstante, la rapidez de la activación de la respuesta a daño y el hecho de que, en ausencia de Wee1 no pudimos observar cambios en los niveles de proteínas de replicación cargados en la cromatina (Figura 28), nos llevan a inclinarnos por una segunda hipótesis. En ella proponemos una regulación de la actividad de la endonucleasa Mus81-Eme1 por parte de Wee1, la cual sería necesaria para asegurar una correcta replicación. Esta regulación podría ser indirecta, implicando el control de Wee1 sobre Cdk2 y de Cdk2



sobre Mus81, o bien directa entre Wee1 y Mus81. Nuestros resultados de interacción entre Wee1 y Mus81 (Figura 29) nos hacen inclinarnos más por una regulación directa entre ambas proteínas.

¿Por qué entonces la supresión de Cdk2 revierte el fenotipo en ausencia de Wee1? Son necesarios más experimentos para contestar a esta pregunta, pero cabe la posibilidad de que no se trate de mecanismos excluyentes, sino complementarios. Sería interesante estudiar si existe también interacción directa entre Mus81 y Cdk2, lo que confirmaría esta idea. Además, nuestro análisis proteómico demostró que Mus81, al ser expresada junto con la versión silvestre de Wee1, es fosforilada en varios residuos de tirosina (Y130, Y423), lo cual concuerda con que esta fosforilación sea llevada a cabo por Wee1 (serina-tirosina-treonina quinasa) y no por Cdk2, ya que ésta es una serina-treonina quinasa.

#### ***4. ¿Cómo controla Wee1 a Mus81-Eme1?***

Como hemos comentado en el apartado anterior, pensamos que el efecto de la falta de Wee1 provoca una desregulación de la actividad de Mus81, lo que posee consecuencias muy negativas para la célula. Esto indica la importancia de un riguroso control de la actividad de esta endonucleasa y concuerda con nuestra propuesta de una nueva vía de regulación mediante la quinasa Wee1, con el fin último de preservar la integridad genómica.

Nuestros experimentos, al igual que los realizados por otros grupos en ausencia de Chk1 (Forment et al., 2011), tampoco nos permitieron observar diferencias en la asociación de Mus81 a cromatina en ausencia de Wee1, pero sí pudimos detectar su fosforilación por Wee1 (Figura 30) en diversas posiciones. Éste se presenta, por tanto, como posible mecanismo por el que esta quinasa podría estar controlando negativamente la actividad de la endonucleasa, evitando, como en el caso de Cds1, cortes indeseados que interfieran en el proceso de replicación.

## 5. Regulación de Mus81-Eme1 durante el ciclo celular

Ha sido descrito que la endonucleasa Mus81-Eme1 está sometida a una estricta regulación en el ciclo celular, siendo activada en la primera división meiótica y mitosis gracias a la fosforilación de la subunidad reguladora, Eme1/Mms4 por la quinasa Plk1 o su ortólogo en levaduras, Cdc5, lo que permite la resolución de las *Holliday junctions* que mantienen unidas las cromátidas hermanas (Gallo-Fernandez, Saugar, Ortiz-Bazan, Vazquez, & Tercero, 2012; Matos et al., 2011).

Resulta interesante que Plk1 sea la encargada de promover la degradación de Wee1 para permitir la entrada en esta fase del ciclo celular (Watanabe et al., 2004), y que su actividad también se encuentre sometida a regulación durante el ciclo, siendo baja en interfase y alta en mitosis (Golsteyn, Mundt, Fry, & Nigg, 1995).

De este modo, y ligado a nuestra propuesta de una posible relación de control entre Wee1 y Mus81, sugerimos la existencia de un triángulo de regulación entre Plk1, Wee1 y Mus81-Eme1, de modo que en interfase Mus81 se mantendría inhibido por un doble mecanismo de inactividad de Plk1 y actividad de Wee1, y se activaría en mitosis, gracias a la acción de Plk1 y degradación de Wee1.

Esta hipótesis podría ser probada en ensayos *in vivo*, expresando en células humanas mutantes de Mus81 para las posiciones que hemos identificado como dianas de Wee1 (ver figura 36 del capítulo *Resultados*). Así, podríamos sustituir estas posiciones por fenilalaninas de modo que estos mutantes no pudieran ser fosforilados y, por tanto, inactivados por Wee1. De esta manera, esperaríamos que su expresión provocara cortes indeseados en el ADN y causara la inducción de la respuesta a daño, la cual esperaríamos que fuera suprimida (o reducida) mediante la eliminación de Plk1, o al expresar una versión catalíticamente inactiva de la misma.

Además, podríamos mutar estas posiciones por residuos de ácido glutámico, que mimetizan aminoácidos fosforilados y, por consiguiente, esperaríamos que estos mutantes fueran constitutivamente inactivos.

También podríamos realizar ensayos *in vitro* en los que midiéramos la actividad endonucleasa de la versión silvestre de Mus81 comparada con mutantes, sobre estructuras secundarias de ADN que funcionaran como sustrato.

Además, como mencionamos anteriormente, se ha descrito la fosforilación de la histona H2AX en mitosis en células con una proliferación normal y en ausencia de la activación de la respuesta a daño en el ADN (Ichijima et al., 2005). Pensamos en la posibilidad de que Mus81 estuviera implicada en este proceso y, por tanto, sería interesante estudiar si la ausencia de Mus81 es capaz de suprimir esta fosforilación.

## ***6. La quinasa Wee1 como potencial diana anticancerígena***

En cánceres esporádicos humanos es frecuente encontrar una vía de ATM-Chk2-p53 defectuosa, debido a deleciones o mutaciones en alguno de sus componentes. Estas células, por tanto, dependen exclusivamente de la vía de respuesta a daño de ATR-Chk1-Cdc25. En concordancia, la inhibición de Chk1 en estas células cancerígenas con la vía de ATM mutada puede conllevar a la muerte celular por catástrofe mitótica, y se ha comprobado que la inhibición de Chk1 sensibiliza a las células tumorales a la radiación y a distintos agentes anticancerígenos, motivo por el cual existen actualmente diversos inhibidores de Chk1 siendo probados en ensayos clínicos en fases I y II (Ma, Janetka, & Piwnicka-Worms, 2011; Medema & Macurek, 2012).

En nuestros estudios pudimos comprobar mediante ensayos de viabilidad que tanto la inhibición como la eliminación de Wee1 causa, por sí sola, un incremento en la mortalidad de las células de hasta 50 veces en comparación con células control (datos no mostrados), efecto que también detectamos en ensayos de citometría a través de la medición de la población sub-G1 (Figura 19). Nuestros resultados muestran, además, que las células carentes de Wee1 acumulan daño en fase S asociado al proceso de replicación, efecto que podría ser aprovechado para eliminar selectivamente las células con una elevada proliferación.

También se ha demostrado que la inhibición de Wee1 incrementa el efecto citotóxico de otros agentes anticancerígenos (De Witt Hamer, Mir, Noske, Van Noorden, & Würdinger, 2011; Hirai et al., 2010; 2009). La explicación a esta sinergia ha sido hasta ahora que la inhibición de Wee1 elimina el *checkpoint* G2/M, conduciendo a las células dañadas por estos agentes a una entrada forzosa en mitosis antes de haber completado la replicación del ADN, resultando en mitosis anormales que culminan en la muerte celular por apoptosis (Aarts et al., 2012). En esta misma línea, actualmente existen inhibidores de Wee1 que están siendo probados en ensayos clínicos, como el inhibidor MK-1775, cuya actividad antitumoral está siendo ensayada tanto en combinación con radioterapia (Bridges et al., 2011) o con otras drogas (De Witt Hamer et al., 2011; Hirai et al., 2010), como en forma de tratamiento único (Kreahling et al., 2012).

Como hemos mencionado anteriormente, Chk1 es también un regulador de la replicación y su eliminación también genera daño en la fase S del ciclo celular (Syljuasen et al., 2005). Por tanto, teniendo en cuenta todos estos datos y el hecho de que tanto la inhibición de Chk1 como de Wee1 conducen a la muerte celular por mecanismos similares, se ha propuesto la utilización combinada de inhibidores de ambas quinasas en el tratamiento contra el cáncer y, de hecho, se ha demostrado que su acción conjunta posee un efecto de toxicidad incrementada en comparación con su inhibición individual en varias líneas celulares procedentes de cánceres humanos (cáncer de mama, ovario, colon y próstata) (Carrassa et al., 2012; Davies et al., 2011). En nuestros estudios detectamos que la eliminación simultánea de Wee1 y Chk1 acentúa la caída en la viabilidad (Figura 19, población sub-G1) y en la velocidad de la horquilla de replicación (Figura 20), en comparación con su eliminación individual, lo que concuerda con un efecto aditivo de la inhibición de ambas quinasas como en estos trabajos recientes.

Por tanto la inhibición conjunta de Wee1 y Chk1 se presenta como un tratamiento de gran efectividad y selectividad, al sobrecargar de daño específicamente a células replicantes y conducir las a una entrada forzosa en mitosis y a la consecuente catástrofe mitótica (De Witt Hamer et al., 2011).

## ***7. MCM4 en ausencia de Wee1***

Cuando estudiamos más a fondo el efecto de la falta de Wee1 en la replicación, descubrimos que afectaba, específicamente, la unión a cromatina de la subunidad MCM4 del complejo MCM (Figura 21). Este complejo, formado por seis proteínas (MCM 2-7), constituye el núcleo donde radica la actividad helicasa en el replisoma y es bastante estable. Por tanto, cabría preguntarse por qué únicamente vemos la activación de la respuesta a daño en ausencia de esta subunidad y por qué solamente ésta ve afectada su asociación a cromatina en ausencia de Wee1.

Existen trabajos que demuestran que no todas las subunidades tienen la misma relevancia funcional dentro del complejo MCM, ya que la eliminación de algunas de ellas (MCM2-3) mediante tratamiento con siRNA es compatible con la proliferación celular, mientras que ésta se ve impedida en ausencia de otras (MCM4-7) (Ibarra et al., 2008).

Cabe también la posibilidad de que algunas subunidades tengan papeles adicionales al ya mencionado en replicación, como se ha descrito para MCM5, que participa en transcripción (Snyder, He, & Zhang, 2005), o MCM7, que parece estar implicada en la activación de la respuesta a daño en el ADN (Cortez, Glick, & Elledge, 2004; Tsao, Geisen, & Abraham, 2004).

En estos trabajos se describe la inducción de la respuesta a daño en ausencia de MCM2, probablemente por acumulación de estructuras aberrantes durante la replicación, mientras que la eliminación de MCM4 conduce a las células a la muerte por apoptosis (Ibarra et al., 2008). En nuestros experimentos no pudimos observar la activación de la respuesta a daño en ausencia de MCM2, aunque sí en ausencia de MCM4 (Figura 22), efecto que no podemos achacar a diferencias en la efectividad de los tratamientos con siRNA, puesto que, como se puede ver en la figura 22, la eliminación de la expresión de MCM2 fue incluso más efectiva que la de MCM4.

En cualquier caso y como pudimos demostrar, la respuesta inducida en ausencia de MCM4 es independiente a la generada en ausencia de Wee1,

ya que ésta es revertida al eliminar Mus81 (Figura 23), mientras que la primera no (Figura 25).

Estos resultados junto con el hecho de que la eliminación de Mu81 rescata la unión a cromatina de MCM4 en ausencia de Wee1, nos permiten situar a esta subunidad corriente abajo de Mus81, sugiriendo que el hecho de que MCM4 se suelte de la cromatina en ausencia de esta quinasa es más una consecuencia que la causa de este fenotipo. Así, cabría imaginar que el daño en el ADN generado por la ausencia de Wee1 (vía Mus81), causaría la desestabilización del replisoma y la consecuente liberación de ciertos componentes como MCM4, lo que a su vez contribuiría, potencialmente, a generar más daño (este efecto correspondería con el daño observado al eliminar MCM4, que mimetizaría el que se soltara de la cromatina). Por qué se suelta solamente esta subunidad y no otras es una pregunta para la que no tenemos respuesta.

#### ***8. Identificación de Wee1 como implicada en el mantenimiento de la estabilidad genómica***

Según comentamos anteriormente, durante la ejecución de este trabajo la identificación de Wee1 como implicada en el mantenimiento de la estabilidad genómica fue realizada por otros grupos (Beck et al., 2010; Murrow, Garimella, Jones, Caplen, & Lipkowitz, 2009). Aunque algunas de las observaciones descritas en estos trabajos son consistentes con nuestros datos, nuestro estudio muestra, por primera vez, el papel de Wee1 en garantizar una correcta replicación mediante la regulación de la endonucleasa Mus81-Eme1 durante la fase S del ciclo celular.

Como se ha mencionado, todavía existen multitud de preguntas sin contestar en este campo, por lo que los resultados descritos en esta tesis aportan luz sobre el mecanismo de acción de Wee1, pero, sobre todo, abren nuevos caminos a explorar. Resultaría interesante continuar estos estudios con experimentos que nos permitan contestar a algunas cuestiones surgidas a lo largo de este trabajo como, por ejemplo, clarificar la implicación de Cdk2 en este mecanismo, o definir con más detalle la relación regulatoria entre Wee1 y Mus81-Eme1.

## V. CONCLUSIONES

1. Wee1 posee un papel en el mantenimiento de la estabilidad genómica y éste es dependiente de su actividad quinasa.
2. Su eliminación o inhibición causa la formación de roturas tanto de cadena sencilla como de la doble hebra de ADN, provocando la activación de una respuesta general a daño en el ADN.
3. Wee1 fosforila tanto a Cdk1 como a Cdk2 en fase S, pero sólo esta última está implicada en el fenotipo generado en su ausencia.
4. La eliminación de Wee1 provoca, además, problemas en la replicación que se traducen en un descenso en la velocidad de progresión de la horquilla y un retraso en la fase S del ciclo celular.
5. Wee1 y Chk1 ejercen funciones similares en el mantenimiento de la estabilidad genómica mediante el control de la replicación, pero a través de vías de señalización distintas.
6. La activación de la respuesta a daño en el ADN y los problemas en la replicación en ausencia de Wee1 son minimizados al inhibir la expresión de la endonucleasa Mus81-Eme1, que genera cortes de cadena sencilla y de la doble hebra del ADN.
7. Wee1 interacciona con Mus81 y la fosforila, pudiendo ser éste el mecanismo de regulación entre estas dos proteínas.
8. La ausencia de la subunidad MCM4 del complejo helicasa MCM causa la inducción de una respuesta a daño en el ADN independiente de Mus81 y diferente a la generada en ausencia de Wee1.
9. Wee1 se autofosforila, pudiendo tratarse de un mecanismo de autorregulación de esta quinasa.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### *1. Análisis automatizado de inestabilidad genómica*

Se cultivaron células U2OS en placas de 96 pocillos en 100  $\mu$ l de medio y se transfectaron usando el reactivo para transfección HiPerFect (QUIAGEN) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Al cabo de 48 horas fueron fijadas con 3% de formaldehído, lavadas con PBS y tratadas con metanol frío. Para analizar la inestabilidad genómica las células fueron teñidas con el anticuerpo anti- $\gamma$ -H2AX (Merck Millipore) y con DAPI. La adquisición de las imágenes se llevó a cabo empleando un microscopio Cellomics ArrayScan VTI (Thermo Fisher Scientific) con un objetivo 10x 0.50 NA, capturando 5 imágenes por pocillo conteniendo unas 1000-2000 células en total. El análisis de las imágenes se hizo con un lector de tipo HCS (*High Content Screening reader* - Cellomics ArrayScan). Las células fueron localizadas por su tinción con DAPI y se midió la intensidad de  $\gamma$ -H2AX por célula. Todas las imágenes y las cuantificaciones automatizadas fueron revisadas visualmente.

### *2. Líneas celulares*

En nuestros experimentos hemos utilizado diversas líneas celulares, tumorales y no tumorales, dependiendo de cada ensayo.

- 293T: Células de riñón fetal humano de morfología epitelial. Expresan el antígeno T de virus SV-40. Altamente transfectables.
- U2OS: Células de osteosarcoma humano. Expresan la forma normal de p53 y Rb, pero no poseen p16.
- Células GM06990: Línea celular linfoblastoide humana.
- Células HT1080: Fibroblastos humanos no transformados.

El medio de cultivo empleado en todos los casos fue DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Lonza), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Lonza), 1,5 mM de L-glutamina (Lonza), 150 U/ml de penicilina y 150  $\mu$ g/ml estreptomycin (Lonza). Todas las líneas celulares fueron



crecidas a 37°C y en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>, en placas de 6, 10 o 15 cm de diámetro de poliestireno no pirogénico (Nunc, Falcon).

### 3. Transfecciones

#### 3.1 Transfección de plásmidos

Se llevó a cabo mediante el método del fosfato cálcico. Para ello se incubó el ADN a transfectar (normalmente 10 µg) con una solución formada por 50 µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M y 450 µl de agua bidestilada, añadiendo a continuación y rápidamente 500 µl de tampón HBS 2X. Las cantidades que se mencionan son para placas de 10 cm de diámetro.

<b>Tampón HBS 2X pH 7,02</b>
280 mM NaCl
1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
12 mM glucosa
10 mM KCl
50 mM Hepes

Seguidamente, añadimos la mezcla anterior a la placa donde 24 horas antes se habían sembrado las células en 8 ml de medio, encontrándose a un 40-60% de confluencia en el momento de la transfección. Transcurridas unas 16 horas de incubación, las células fueron lavadas con PBS e incubadas en medio fresco por 24 horas más, al cabo de las cuales se realizaron los extractos.

#### 3.2 Eliminación de la expresión de proteínas por ARN interferente (siRNA)

Las transfecciones con siRNA las llevamos a cabo de la siguiente manera (se indican las cantidades para placas de 6 cm de diámetro):

Por un lado preparamos una solución con 5 µl de Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) y 250 µl de medio Opti-MEM (Invitrogen). Por

otro, mezclamos 5 µl del oligonucleótido de interés (20 µM) con 250 µl de Opti-MEM. Juntamos ambas soluciones y dejamos reposar 20 minutos a temperatura ambiente, momento en el que aprovechamos para cambiar el medio de las células a transfectar por 2 ml de medio fresco, placas donde 24 horas antes habíamos sembrado las células, encontrándose a un 20-40% de confluencia.

Transcurrido el tiempo de incubación, añadimos la mezcla (reactivo de transfección/oligonucleótido) a las placas e incubamos a 37°C durante 24 o 48 horas, dependiendo de la proteína cuya expresión queríamos eliminar. En casos extremos, hicimos una segunda transfección 24 horas después de la primera, y las células fueron recogidas a 48h después de esta última transfección.

Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes (se muestra la secuencia de la cadena *forward* o directa; todos los dúplex tienen una extensión dTdT en el extremo 3’):

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Casa comercial
BLM	UGCAAUACACAUCGCUGCU	Invitrogen
Cdk1	GAUGUAGCUUUCUGACAAAAA	Thermo Fisher Scientific
Cdk2	UGCGAUAACAAGCUCCGUCC	Thermo Fisher Scientific
Chk1 #1	GCGUGCCGUAGACUGUCCA	Thermo Fisher Scientific
Chk1 #2	GCAACAGUAUUUCGGUAUA	Thermo Fisher Scientific
Eme1	GGAUAAAGAACGCCAGAAU	Thermo Fisher Scientific
Exo1	CAAGCCUAUUCUCGUAUUU	Invitrogen
Gen1	GUAAAGACCUGCAAUGUUA	Thermo Fisher Scientific
MCM2	UCCAUGCCAUCUCCAUGAGGCUCC	Invitrogen
MCM4	SMARTpool	Thermo Fisher Scientific

Mus81	CAGGAGCCAUCAAGAAUAA	Invitrogen
Wee1 #1	AAUAGAACAUCUCGACUUA	Thermo Fisher Scientific
Wee1 #2	AAUAUGAAGUCCCGGUAUA	Thermo Fisher Scientific
Wee1 #3	GAUCAUAUGCUUAUACAGA	Thermo Fisher Scientific
Wee1 #4	CGACAGACUCCUCAAGUGA	Thermo Fisher Scientific

En la mayoría de los experimentos Wee1 fue eliminado empleando el oligonucleótido #2.

### *3.3 Transfección conjunta de siRNA y plásmidos de ADN*

Para la transfección simultánea de siRNA y plásmidos de ADN utilizamos el reactivo Metafectene Pro (Biontix) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello realizamos una mezcla conteniendo un máximo de 2 µg de ADN y 1 µg de siRNA en 100 µl de Opti-MEM y, separadamente, mezclamos 8 µl de Metafectene Pro en 100 µl de Opti-MEM. Mezclamos ambas soluciones e incubamos unos 20 minutos a temperatura ambiente, tiempo en el que aprovechamos para cambiar el medio de las células por 2 ml de medio fresco (cantidades para placas de 6 cm). Transcurridos los 20 minutos añadimos la mezcla a las placas donde las células fueron crecidas hasta un 90%, e incubamos a 37°C. Al cabo de 16 horas, lavamos las células con PBS y las incubamos en medio fresco 24 horas más, antes de hacer los extractos.

### *4. Plásmidos y clonaje*

El plásmido Flag-Chk1 fue un regalo de Jiri Bartek (Institute of Cancer Biology and Centre for Genotoxic Stress Research, Copenague - Dinamarca), y el plásmido Flag-Gen1 fue cedido por Steve West (London Research Institute, Cancer Research UK, Clare Hall Laboratories, Londres - Reino Unido).

La secuencia codificante para Wee1 fue clonada en fase en un vector pCMV Tag2B (Agilent Technologies) para generar la versión de Wee1 marcada con una etiqueta Flag. La versión inactiva de Flag-Wee1 fue obtenida por mutagénesis dirigida sobre el vector original, en el cual la lisina 328 fue mutada a alanina utilizando el QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies) con los cebadores:

- **Cebador con sentido**

5' → 3'

GATGGATGCATTTATGCCATTCGACGATCAAAAAAGCATT  
GGCG

- **Cebador antisentido**

5' → 3'

CGCCAATGGCTTTTTTGGATCGTCTGAATGGCATAAATGCATC  
CATC

## 5. *Western blot*

### 5.1 *Lisis desnaturalizante*

Los extractos celulares totales para el análisis por *Western blot* fueron obtenidos añadiendo a cada placa un tampón de lisis desnaturalizante y recogiendo el lisado con un raspador de células (Greiner bio-one).

<b>Tampón de lisis desnaturalizante</b>
6 M urea 1% SDS 125 mM NaCl 25 mM Tris pH 8

Finalmente, se sometieron las muestras a sonicado suave (10 segundos, 60-80% de potencia, con un sonicador modelo UP100H de Hielsher Ultrasonic) y se mantuvieron a -20°C hasta su análisis.

## 5.2 Electroforesis

El análisis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida con SDS, a diferentes porcentajes (entre 6% y 12%) según el tamaño de las proteínas a separar. Para ello, se cargaron, dependiendo del experimento, entre 20 y 40 µg de proteína total en cada pocillo, con tampón de carga desnaturante a una concentración final 1X y previamente calentadas a 95°C por 5 minutos. La electroforesis, con un gel compactador y un gel separador, se llevó a cabo utilizando el sistema mini-protean 3 (BioRad), a 140-160 V hasta que el frente de avance saliera del gel.

<b>Gel compactador</b>	<b>Gel separador</b>
125 mM Tris-HCl pH 6,8 0,1% SDS 5% acrilamida:bisacrilamida (29:1)	375 mM Tris-HCl pH 8,8 0,1% SDS 6-12% acrilamida:bisacrilamida (29:1)

<b>Tampón de carga desnaturante (Laemmli) 4X</b>	<b>Tampón de electroforesis PAGE-SDS</b>
250 mM Tris-HCl pH 6,8 40 % glicerol 8 % SDS 8% β-mercaptoetanol 0,02% azul de bromofenol	25 mM Trizma base 192 mM glicina 0,1% SDS

## 5.3 Transferencia y bloqueo

Para la técnica de *Western blot*, después de finalizar la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Protran BA 85, Whatman) utilizando el sistema mini-protean 3 (BioRad) en tampón de transferencia, generalmente por 1 hora, a 280-300 mA. El bloqueo de estas membranas, salvo excepciones, se realizó con una solución al 5% de leche desnatada en TBS-T 0,2%, durante un tiempo mínimo de 1 hora, en agitación suave y a temperatura ambiente.

<b>Tampón de transferencia</b>	<b>Tampón TBS-T 0,2% pH 7,4</b>
25 mM Trizma base 192 mM glicina 20 % etanol	25 mM Trizma base 10 mM KCl 270 mM NaCl 0,2% Tween-20

#### *5.4 Anticuerpos*

La detección de las proteínas transferidas se consiguió mediante incubación con anticuerpos primarios, tanto procedentes de casas comerciales, como de producción casera. Se emplearon diferentes concentraciones según el anticuerpo y la incubación fue realizada en la misma solución de bloqueo, a 4°C, durante toda la noche y en agitación. Después de 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-T 0,2%, las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios unidos a la peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson Immunoresearch) contra el anticuerpo primario utilizado. En este caso, se incubó durante 1 hora en TBS-T 0,2%, a una dilución 1:10.000 y a temperatura ambiente. Después de esta incubación, se realizaron tres lavados de 10 minutos en TBS-T 0,2% y, finalmente, se procedió al revelado con las soluciones Supersignal West Pico Luminol (PIERCE). La detección de la quimioluminiscencia se hizo con películas radiográficas (Kodak). A continuación, se listan los anticuerpos usados en esta tesis:

<i>Diana</i>	<i>Origen</i>	<i>Dilución</i>	<i>Fuente</i>
<b>53BP1</b>	Conejo	1:2000	Producción propia
<b>ATR</b>	Cabra	1:500	Santa Cruz Biotechnology Inc
<b>BLM</b>	Conejo	1:2000	Producción propia (J. Lee et al., 2001; Rendtlew Danielsen et al., 2009; Semple, Smits, Fernaud, Mamely, & Freire, 2007; Toueille, 2004)
<b>Cdc45</b>	Conejo	1:4000	Cedido por Juan Méndez*
<b>Cdc6</b>	Ratón	1:3000	Cedido por Juan Méndez*
<b>CDK1</b>	Ratón	1:1500	Santa Cruz Biotechnology Inc
<b>CDK2</b>	Conejo	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Inc
<b>Chk1</b>	Ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc
<b>Claspin C-t</b>	Conejo	1:4000	Producción propia, descrito en (Mamely et al., 2006)
<b>Cyclin A</b>	Conejo	1:500	Santa Cruz Biotechnology Inc
<b>Cyclin E</b>	Ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc
<b>Eme1</b>	Conejo	1:2000	Producción propia
<b>Flag</b>	Ratón	1:1500	Sigma-Aldrich
<b>Geminin</b>	Conejo	1:2000	Producción propia
<b>Gen1</b>	Conejo	1:2000	Producción propia
<b>GFP</b>	Conejo	1:2000	Producción propia
<b>Grb2</b>	Ratón	1:2000	BD
<b>HA</b>	Ratón	1:2000	Roche
<b>Hex1</b>	Conejo	1:2000	Produccion propia
<b>Ku80</b>	Cabra	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Inc.
<b>MCMs</b>	Conejo	1:1500	Todos cedidos por Juan Méndez*
<b>Mus81</b>	Ratón	1:4000	Abcam
<b>Mus81</b>	Ratón	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Inc.
<b>ORC2</b>	Conejo	1:4000	Santa Cruz Biotechnology Inc.
<b>PCNA</b>	Ratón	1:1000	MERCK-Millipore
<b>p-Chk2</b>	Conejo	1:1000	Cell Signaling
<b>p-H3</b>	Conejo	1:5000	Genscript
<b>p-Tyr</b>	Ratón	1:1000	Cell Signaling
<b>pTyr 130 -Mus81</b>	Conejo	1:500	Producción propia: encargado a Genscript
<b>pSer317-Chk1</b>	Conejo	1:2000	Bethyl Laboratories Inc.
<b>pSer343-Nbs1</b>	Conejo	1:1000	Genscript
<b>pSer345-Chk1</b>	Conejo	1:1500	Cell Signaling Technology
<b>pSer957-Smc1</b>	Conejo	1:1000	Genscript
<b>pTyr15-Cdk1</b>	Conejo	1:5000	Cell Signaling Technology

<b>pTyr15-Cdk2</b>	Conejo	1:10.000	Abcam
<b>Rad9</b>	Conejo	1:3000	Producción propia (J. Lee et al., 2001; Rendtlew Danielsen et al., 2009; Semple et al., 2007; Toueille, 2004)
<b>RPA70</b>	Ratón	1:1000	MERCK-Millipore
<b>SQ/TQ</b>	Conejo	1:1500	Cell Signaling
<b>TopBP1</b>	Conejo	1:2000	Producción propia (J. Lee et al., 2001; Rendtlew Danielsen et al., 2009; Semple et al., 2007; Toueille, 2004)
<b>Wee1 (B-11)</b>	Ratón	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Inc.
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	Ratón	1:5000	Sigma-Aldrich
<b><math>\gamma</math>-H2AX</b>	Conejo	1:3000	Genscript
<b><math>\gamma</math>-H2AX</b>	Ratón	1:1000	Millipore

\*Juan Méndez, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid – España

## 6. Cuantificación de proteínas

### 6.1 Método del ácido bicinconínico

La concentración de proteína total de las muestras fue determinada en una placa de 96 pocillos mediante este ensayo bioquímico colorimétrico, basado en la realización de una recta de calibrado utilizando cantidades crecientes y conocidas de proteína BSA (albúmina de suero bovino). En la misma placa se colocaron las muestras a cuantificar y se añadió a cada pocillo 150  $\mu$ l de una mezcla 50:1 de ácido bicinconínico (Novagen):sulfato de cobre (Novagen, 4%). La placa fue incubada a 37°C durante 30 minutos, al cabo de los cuales se realizó la medición de la absorbancia a 540 nm de longitud de onda con un espectrofotómetro de placa (Labsystems). Los valores de absorbancia obtenidos para las muestras y la recta de calibrado fueron procesados realizando una regresión lineal de Pearsons, y obteniendo, finalmente, la concentración de proteínas de cada muestra.



### Recta de calibrado

	0 µg	1 µg	2 µg	5 µg	10 µg	20 µg
<b>BSA (0,5 µg/ µl)</b>	0 µl	2 µl	4 µl	10 µl	-	-
<b>BSA (2 µg/ µl)</b>	-	-	-	-	5 µl	10 µl
<b>Agua</b>	20 µl	18 µl	16 µl	10 µl	15 µl	10 µl
<b>Tampón de lisis</b>	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl

### Muestras

<b>Muestra</b>	3 µl
<b>Agua</b>	20 µl

#### 6.2 Método de Bradford

Este método fue empleado cuando el tampón en el que se realizaron los extractos incluía algún componente que podía interferir con la medición de proteínas por el método del ácido bicinconínico (generalmente el ditioneitol o DTT). En este caso, tanto la recta de calibrado como las muestras se prepararon de la misma manera que en el caso anterior, pero los cambios en la absorbancia se produjeron añadiendo 150 µl de reactivo Bradford (Sigma) a cada pocillo e incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. La medición se realizó a 595 nm y los datos se analizaron de la misma manera.

### 7. Inmunofluorescencia

Para realizar esta técnica, las células fueron crecidas sobre cubreobjetos de vidrio en placas durante 24 horas antes de la transfección (siRNA o plásmido, como se ha indicado anteriormente).

En general, 36 o 48 horas (transfección con plásmido o siRNA, respectivamente) después de la transfección tomamos los cubres y los lavamos con PBS varias veces. La fijación se realizó en 2% de formaldehído y 0,2% de Tritón X-100 en PBS durante 20 minutos. A continuación, lavamos durante 3 minutos con PBS y permeabilizamos con

Tritón X-100 al 0,1% en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente lavamos de nuevo con PBS y bloqueamos con suero fetal bovino al 1% en PBS durante 1 hora. La incubación con el anticuerpo primario fue realizada a una dilución 1:100-1:1000 en la solución de bloqueo durante toda la noche y a 4°C. Al día siguiente lavamos con 0,5% de suero fetal bovino en PBS e incubamos con el anticuerpo secundario ALEXA-Fluor 488 (verde) y/o 546 (rojo) (Invitrogen) a una dilución de 1:600 en PBS con 0,5% de suero fetal bovino, por 1 hora y a temperatura ambiente. Lavamos con PBS durante 3 minutos y, por último, con agua para evitar la autofluorescencia del PBS. Finalmente, procedimos al montaje sobre portaobjetos. El medio de montaje empleado fue Slow Fade (Invitrogen) con DAPI para el marcaje del ADN. Las muestras montadas se analizaron con un microscopio de fluorescencia (Cell Observer, Carl Zeiss) con lentes de magnificación 20x NA 0,8, 40x NA 1,3 y 63x NA 1,4, equipado con una cámara AxioCam MR3 y software AxioVision (Carl Zeiss). Los ajustes posteriores de las imágenes se llevaron a cabo empleando Photoshop (CS3; Adobe).

En los casos en que se estudia la incorporación de BrdU, ésta fue detectada mediante el detection kit II (Roche) según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las células fueron crecidas sobre cubreobjetos hasta un 50% de confluencia, hasta que se cambió el medio de cultivo por medio fresco conteniendo 10  $\mu$ M BrdU. Se incubaron las células a 37°C durante 15-60 minutos (dependiendo del experimento), y se eliminó el medio con BrdU antes de lavar los cubres tres veces con solución de lavado. Las células fueron entonces fijadas con el fijador etanol-glicina (50 mM de glicina y 70% etanol, pH 2) durante al menos 20 minutos a una temperatura de -20°C. Luego, se lavaron los cubres tres veces con solución de lavado y se incubaron con solución anti-BrdU, que contiene una nucleasa y el anticuerpo contra BrdU, durante 30 minutos a 37°C. Se lavaron de nuevo los cubres tres veces con solución de lavado y se añadió el anticuerpo secundario correspondiente durante 30 minutos a 37°C. Se realizaron tres nuevos lavados y se cubrieron las muestras con el medio de montaje. Finalmente, se examinaron las muestras en el microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados.

## 8. Inmunoprecipitación

### 8.1 Condiciones nativas

La obtención de los extractos celulares para la inmunoprecipitación de proteínas en condiciones nativas se realizó en un tampón de lisis con la siguiente composición:

<b>Tampón de lisis IP condiciones nativas</b>
50 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl EDTA 5 mM 0,5% NP40

Además, añadimos 1 mM DTT, inhibidores de fosfatasa (1 mM NaF; 1 mM ortovanadato sódico y 10 mM  $\beta$ -glicerolato) e inhibidores de proteasas (Complete EDTA free, Roche Diagnostics).

La lisis celular la llevamos a cabo añadiendo 500  $\mu$ l de tampón por cada placa de 10 cm de diámetro o 1,5 ml en el caso de placas de 15 cm de diámetro, previamente lavadas con PBS, y recogiendo el extracto con un raspador de células. A continuación, mantuvimos los extractos en hielo durante 10 minutos para permitir la rotura de las células, al término de los cuales centrifugamos las muestras por 15 minutos a 13.000 rpm y a 4°C, para eliminar restos celulares insolubles. En este punto, guardamos 50  $\mu$ l de la muestra como extracto celular total de referencia (*input*) para el análisis por *Western blot*. Incubamos durante 1 hora el resto del extracto en presencia del anticuerpo dirigido contra la proteína a inmunoprecipitar y, más tarde, añadimos la resina de proteína A-sepharose CL-4B (GE Healthcare), incubando en una rueda de agitación, a 4°C durante 2 horas más. Transcurrido el tiempo de incubación, lavamos la resina tres veces con tampón de lisis y procedimos a la elución de las proteínas inmunoprecipitadas mediante calentamiento a 96°C en buffer Laemmli y centrifugado para eliminar la resina. Las muestras fueron analizadas por *Western blot*. En el caso de que el anticuerpo estuviera covalentemente

unido a la resina (ver mas adelante), eluimos con glicina-HCl 150 mM pH 2,3, por 3 veces e incubando 5 min cada paso de elución. Al final, juntamos el eluido de estos tres pasos y elevamos el pH hasta 7,5-8 con Tris 1M pH 8,8.

## 8.2 Condiciones desnaturalizantes

La inmunoprecipitación de proteínas se realizó en condiciones desnaturalizantes en aquellos casos en los que nuestro objetivo era detectar la fosforilación de la proteína inmunoprecipitada, GFP-Mus81, por *Western blot* y mediante el uso de un anticuerpo fosfoespecífico. Elegimos este método por ser el que más eficientemente precipitaba la proteína y también para evitar su desfosforilación. Los extractos celulares se realizaron añadiendo 100 o 400  $\mu$ l de tampón de lisis para placas de 10 o 15 cm respectivamente.

<b>Tampón de lisis IP condiciones desnaturalizantes</b>
50 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% Tritón X-100 1% SDS

Además, añadimos DTT (1 mM), inhibidores de fosfatasa (5 mM NaF y 10 mM  $\beta$ -glicerolato) e inhibidores de proteasas (Complete EDTA free, Roche Diagnostics), y recogimos las células con un raspador. Seguidamente, calentamos las muestras a 95°C durante 5 minutos para favorecer la desnaturalización de las proteínas y, a continuación, diluimos la muestra con 900  $\mu$ l (extractos provenientes de placas de 10 cm) o 3,6 ml (placas de 15 cm) de buffer de lavado sin SDS (misma composición que el buffer de lisis, pero sin SDS). Sonicamos las muestras (sonicador modelo UP100H de Hielsher Ultrasonic) durante 15 segundos a una potencia del 90% e incubamos a 4°C durante 10 minutos. A continuación, eliminamos los restos celulares insolubles por centrifugación a 13.000 rpm, durante 10

minutos a 4°C. En este punto recogimos 50-100 µl de extracto celular total como *input* para el posterior análisis por *Western blot*. El resto del extracto fue incubado con la proteína A-sepharose CL-4B (GE Healthcare) unida covalentemente al anticuerpo (ver protocolo descrito a continuación).

Para la elución de las proteínas, lavamos la resina tres veces con buffer de lavado e incubamos posteriormente con 25 µl de glicina 150 mM, pH 2,3 a temperatura ambiente, durante 3 minutos, agitando suavemente cada cierto tiempo para favorecer la separación de la proteína y el anticuerpo. Transcurridos estos minutos, centrifugamos a 4000 rpm y pasamos el sobrenadante conteniendo nuestra proteína de interés a un tubo nuevo. Este paso fue repetido dos veces más, obteniendo un volumen final de 75 µl de eluido. Por último, añadimos 20 µl de tampón Laemmli 4X y ajustamos el pH con 10 µl de Tris 1M pH 8.

### ***9. Unión covalente de anticuerpos a resina de proteína A-sepharose***

Para algunos experimentos de inmunoprecipitación en los que el anticuerpo empleado podía interferir en el análisis de los resultados por *Western blot*, llevamos a cabo su unión covalente a la resina de proteína A-sepharose mediante el agente entrecruzante DMP (dimetil pimelimidato). Para ello, mezclamos 150 µl de resina, previamente lavada con PBS, y 100 µl de suero hasta un volumen final de 1 ml de PBS y los incubamos a 4°C, en rotación, durante 1 hora. Después, recogimos la resina unida al anticuerpo mediante centrifugación suave (3000 rpm por 1 minuto en centrífuga de mesa) y lavamos con PBS. Para conseguir la unión covalente del anticuerpo a la resina, añadimos 1 ml de una solución recién preparada de 20 mM de DMP y 200 mM de Hepes pH 8,5 e incubamos en rotación a temperatura ambiente por 1 hora. Luego, recogimos la resina por centrifugación y bloqueamos el DMP sobrante añadiendo 1 ml de una solución 50 mM de Tris pH 8,0 e incubando en rotación por 5 minutos. Este paso se repitió dos veces más. Finalmente, para eliminar todo el anticuerpo no unido covalentemente, lavamos con 1 M de glicina a pH 3, realizamos un último lavado con PBS y lo almacenamos en esta misma solución a 4°C hasta su utilización.

## 10. Fraccionamiento de la cromatina

El fraccionamiento bioquímico de las células se realizó esencialmente como ha sido descrito previamente (Méndez & Stillman, 2000; Smits, Reaper, & Jackson, 2006). Las células fueron recogidas por tripsinización, lavadas con PBS, y resuspendidas en 200 µl de solución A. Seguidamente, se añadió Tritón X-100 a una concentración final de 0,1 %, y se mezcló golpeando suavemente. Los extractos fueron incubados en hielo durante 5 minutos y a continuación fueron centrifugados a 1300 g durante 4 minutos para la obtención de las fracciones citoplásmica (S1) y nuclear. Los núcleos aislados fueron lavados con la misma solución A, lisados en 150 µl de solución B hipotónica e incubados en hielo durante 10 minutos. La fracción soluble nuclear (S2) y la fracción de cromatina fueron separadas por centrifugación a 1700 g durante 4 minutos. El precipitado de cromatina aislado (P2) fue lavado en solución B, centrifugado a 10.000 g por 1 minuto y resuspendida en 150 µl de tampón Laemmli 2X sin β-mercaptoetanol ni azul de bromofenol. Finalmente, el precipitado de cromatina fue hervido durante 5 minutos a 96°C y sonificado por 15 segundos al 60% de potencia (sonicador modelo UP100H de Hielsher Ultrasonic). La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método de Bradford para la fracción soluble nuclear y citoplásmica (en general para distinguir la fracción nuclear insoluble del resto, mezclamos las fracciones solubles S1 y S2), mientras que para la fracción de cromatina se empleó el método del ácido bicinónico. El análisis fue llevado a cabo mediante *Western blot*, cargando cantidades equivalentes de proteína total de la fracción soluble y de cromatina.

Solución A	Solución B
10 mM HEPES pH 7,9 10 mM KCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,34 M sacarosa 10% glicerol	3 mM EDTA 0,2 mM EGTA
1 mM DTT inhibidores de proteasas inhibidores de fosfatasas	

<b>Tampón Laemmli 2X (sin <math>\beta</math>-mercaptoetanol ni azul de bromofenol)</b>
--

4 % SDS 20% glicerol 120 mM Tris pH 6,8
---

## ***11. Citometría de flujo***

### *11.1 Tinción con ioduro de propidio*

Para el análisis de estadios de ciclo celular, las células fueron recogidas por tripsinización, centrifugadas suavemente (1500 rpm, 5 minutos), lavadas con PBS, fijadas con etanol 70% y mantenidas a 4°C durante un tiempo mínimo de 2 horas, hasta el momento de la tinción y medición. Antes de la medición, las muestras fueron centrifugadas y lavadas con PBS para proceder, seguidamente, con la permeabilización y tinción del ADN con ioduro de propidio (Sigma):

<b>Solución de permeabilización y tinción con ioduro de propidio (en PBS)</b>
---

0,1% Tween 20 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ioduro de propidio 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ARNasa
---

Incubamos cada muestra con 500-800  $\mu\text{l}$  de esta solución durante 20-30 minutos a 37°C y en oscuridad, para permitir la actuación de la ARNasa (Sigma), y procedimos a la medición inmediatamente después con un citómetro Epics XL-MCL (Beckman Coulter) o LSR II (BD), con un software EXPO32 ADC en el primer caso y FACSDIVA en el segundo.

La incorporación de yoduro de propidio es directamente proporcional al contenido de ADN, que variará entre 2N y 4N dependiendo de la fase del ciclo celular en que se encuentren las células de la muestra. El láser del citómetro detecta la fluorescencia de este agente intercalante en cada célula de manera individual, y los resultados se agrupan en poblaciones que se representan en una gráfica, pudiendo diferenciar el porcentaje de células en las fases G1, S o G2/M.

### *11.2 Tinción de la histona H2AX fosforilada ( $\gamma$ -H2AX)*

El marcaje de  $\gamma$ -H2AX se realizó como ha sido descrito anteriormente con leves modificaciones (X. Huang & Darzynkiewicz, 2006). Las células son recogidas por centrifugación a 300 g durante 4 minutos a temperatura ambiente y resuspendidas en 0,5 ml de PBS. Posteriormente, se transfiere la muestra a un tubo de polipropileno conteniendo 4,5 ml de una solución fría formada por 1% formaldehído sin metanol (Panreac) en PBS y se mantiene en hielo durante 15 minutos. A continuación, se centrifuga a 300 g por 4 minutos a temperatura ambiente y se resuspenden las células en 0,5 ml de PBS. Se vuelve a centrifugar y a resuspender nuevamente en 0,5 ml de PBS. Se transfiere la muestra a un tubo con 4,5 ml de etanol al 70% frío, donde se deben mantener las células a -20°C durante un mínimo de 2 horas y un máximo de 2 semanas. Seguidamente, se centrifuga a 200 g por 4 minutos a temperatura ambiente, se elimina el etanol y se resuspende en 2 ml de solución BSA-T-PBS.

A continuación, se centrifuga a 300 g por 4 minutos a temperatura ambiente, se vuelven a resuspender las células en 2 ml de solución BSA-T-PBS, y se mantienen por 5 minutos también a temperatura ambiente. Se centrifugan nuevamente a 300 g por 4 minutos a temperatura ambiente y se resuspenden en 100  $\mu$ l de una solución conteniendo 1  $\mu$ l del anticuerpo primario anti-  $\gamma$ -H2AX de conejo. Se tapan los tubos para evitar evaporación de las muestras y se incuban a 4°C toda la noche. Tras esta incubación, se añaden 2 ml de BSA-T-PBS y se centrifuga a 300 g por 4 minutos a temperatura ambiente. Luego, se resuspenden las células en 2 ml de BSA-T-PBS y se centrifuga a 300 g por 4 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se resuspende la muestra en 100  $\mu$ l de BSA-T-



PBS conteniendo el anticuerpo secundario contra conejo marcado con Alexa 488 y se incubaba por 1 hora a temperatura ambiente, agitando suavemente de vez en cuando. Luego, se añaden 5 ml de BSA-T-PBS y, tras 2 minutos, se centrifuga a 300 g por 4 minutos a temperatura ambiente. Por último, se resuspenden las células en 1 ml de solución de tinción con yoduro de propidio (Molecular Probes) y se incubaba a temperatura ambiente durante 30 minutos y en oscuridad. La medición en el citómetro se realizó con los filtros correspondientes para la medida de yoduro de propidio y Alexa 488. En todos los casos el análisis de las muestras se llevó a cabo con los citómetros mencionados anteriormente.

<b>Solución BSA-T-PBS</b>	<b>Solución de tinción con yoduro de propidio</b>
1% BSA 0,2% Tritón X-100 PBS	1 mg/ml IP agua destilada

## ***12. Viabilidad celular***

Para el ensayo de viabilidad celular sembramos 670.000 células U2OS en cada placa de 6 cm y transfectamos con ARN interferente control o con el ARN interferente contra la proteína de estudio, siguiendo el protocolo de Lipofectamine RNAiMAX. Al cabo de 48 horas, tripsinizamos las células y las pasamos a placas de 6 cm a una densidad de 1500 células por placa (siRNA control) o 75.000 células por placa (siRNA contra Wee1). 24 horas más tarde, llevamos a cabo cada tratamiento por triplicado, y crecimos las células por unos 12 días hasta la formación de colonias visibles y fácilmente contables. Al cabo de este tiempo, procedimos a la tinción de las colonias, para lo que lavamos primero con PBS y añadimos cristal violeta durante 10-15 minutos. Finalmente, realizamos el recuento de las mismas y los datos obtenidos fueron analizados con Excel.

<b>Cristal Violeta</b>
10% formaldehído 80% metanol 0,25% cristal violeta

### ***13. Inhibición de Wee1***

El inhibidor selectivo contra Wee1 fue adquirido a Calbiochem (Wee1 Inhibitor II) y empleado a una concentración final de 10  $\mu$ M.

### ***14. Ensayo quinasa in vitro***

Los ensayos para medir la actividad quinasa *in vitro* de Wee1 y Cdk2 se llevaron a cabo utilizando como sustrato proteínas recombinantes marcadas con una etiqueta GST, expresadas en bacteria y purificadas mediante resina de Gluthation-sepharose 4B (GE Healthcare). Las proteínas-quinasas cuya actividad queríamos medir se expresaron en células 293T, fusionadas a una etiqueta FLAG y aisladas mediante inmunoprecipitación con resina anti-FLAG M2 agarosa (Sigma-Aldrich).

Para evitar que la presencia de ambas resinas pudiera interferir en la reacción de fosforilación, eluimos las proteínas marcadas con GST de su resina mediante adición de 40 mM de glutatión reducido al tampón del ensayo quinasa. Para el ensayo de actividad, incubamos el sustrato junto con la quinasa unida a la resina en un volumen final de 30  $\mu$ l y añadimos ATP no marcado a una concentración final de 10  $\mu$ M. La reacción se dejó transcurrir durante 30 minutos a 30°C y se finalizó añadiendo tampón Laemmli y calentando las muestras a 100°C durante 5 minutos. El análisis se realizó por *Western blot*, con anticuerpos fosfo-específicos que se indican en la tabla del apartado *Anticuerpos*.

<b>Tampón ensayo quinasa <i>in vitro</i></b>
50 mM de Tris ph 7,5 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MnCl <sub>2</sub> 1 mM DTT 10 mM $\beta$ -glicerolato

## ***15. Radiación UV***

La irradiación de células se llevó a cabo con una fuente de radiación UV-C (Philips) a una dosis de  $40 \text{ J/m}^2$ , medida por UVmetro (UVP – Ultra-Violet Products), en placas en las que, en el momento del tratamiento y para evitar interferencias, sustituimos el medio por 1 o 2 ml de PBS (placas de 6 o 10 cm respectivamente). Tras la irradiación volvimos a añadir el medio e incubamos a  $37^\circ\text{C}$  durante los tiempos indicados en cada experimento y realizamos los extractos.

## ***16. Sincronizaciones***

### *16.1 Sincronización en fase G1/S*

La sincronización de células en fase S temprana se consiguió mediante la adición del nucleótido timidina al medio de cultivo a una concentración final de 2,5 mM por un mínimo de 24 horas. Para el estudio de las células en distintos puntos de la fase S, transcurridas estas 24 horas se retiró el medio, se lavó varias veces con PBS y se añadió medio nuevo sin timidina, recogiendo posteriormente las muestras a los tiempos deseados.

### *16.2 Sincronización en mitosis*

Para obtener una población de células en fase M, añadimos timidina al medio a 2,5 mM durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, lavamos las células con PBS y añadimos medio fresco para permitir la salida del bloqueo en fase S. Al cabo de unas 7 horas en este medio, añadimos nocodazol a una concentración de 250 ng/ml e incubamos durante 16 horas para aumentar la población de células en mitosis. Finalmente, realizamos extractos de las células mitóticas recogidas mediante agitación de la placa con pequeños golpes (*shake off*) y centrifugación.

### *16.3 Sincronización en fase G2*

Para el estudio de células en fase G2, se llevó a cabo la sincronización en fase M como acabamos de describir, recogiendo, en este caso, las células que quedaron pegadas a la placa tras eliminar las mitóticas mediante el método de *shake off*.

### *17. Ensayo de análisis de fibras de ADN*

Este ensayo se desarrolló como ha sido descrito anteriormente por otros grupos (Anglana et al., 2003). Las células fueron marcadas mediante pulsos durante 20 minutos con 100 mM IdU y durante otros 20 minutos con 100 mM CldU. El ADN genómico fue preparado a partir de ADN embebido en bloques de agarosa de bajo punto de fusión, y las fibras de ADN fueron extendidas sobre cubreobjetos silanizados. El ADN de nueva síntesis fue inmunodetectado con anticuerpos anti-BrdU FITC de ratón (BD), anti-BrdU de rata (AbD Serotec), anti-ratón de cabra Alexa Fluor 488-conjugado (Invitrogen), y anti-rata de cabra Alexa Fluor 555-conjugado (Invitrogen). Las fibras de ADN fueron detectadas con un anticuerpo anti-ADN-monocatenario de ratón (Millipore), anti-ratón de cabra Cy5.5-conjugado y anti-cabra de burro Cy5.5-conjugado (Abcam). Las muestras fueron analizadas con un microscopio de epifluorescencia (Axio Imager.Z2; Carl Zeiss) equipado con un objetivo de magnificación 63x (NA 0,7-1,4) conectado a una cámara (Cool-SNAP HQ2; Roper Scientific) y la captura de imágenes se realizó con un software MetaMorph (Roper Scientific).

### *18. Análisis proteómico*

#### *18.1 Preparación de muestras*

Las proteínas fueron separadas en un gel de gradiente NuPAGE Novex Bis-Tris (Invitrogen). Las bandas deseadas fueron cortadas del gel y digeridas con tripsina (Shevchenko, Tomas, Havlis, Olsen, & Mann, 2006)

y los péptidos fueron concentrados y desalados (Rappsilber, Ishihama, & Mann, 2003).

### *18.2 Espectrometría de masas*

Los péptidos digeridos fueron eluidos con un tampón compuesto por 80% de acetonitrilo (CAN) y 0,5% de ácido acético; el volumen se redujo a 2  $\mu$ l y se acidificó con 5  $\mu$ l de 1% de trifluoroacético (TFA), 2% de tampon AcN. 3  $\mu$ l de los péptidos fueron entonces separados mediante cromatografía reversa de nanoescala C18 (Proxeon Biosystems), y procesados mediante un espectrómetro de masas de trampa lineal de cuadrupolo Velos (LTQ)-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Alemania), mediante una fuente iónica de nanoelectrospray (Proxeon Biosystems).

La separación cromatográfica de los péptidos se realizó en un emisor (Proxeon Biosystems) montado con una resina de fase reversa de 1,9  $\mu$ m Reprosil Pur C18-AQ (Dr. Maisch GmbH) y eluida mediante un flujo de 200 nl/min de ácido acético desde 5% a 70%, en un gradiente de 140 minutos. Los péptidos de la columna de HPLC fueron directamente pulverizados en el espectrómetro de masas.

Los espectros completos ( $m/z$  300–1650) fueron adquiridos en la Orbitrap, con una resolución de 60.000 a  $m/z$  400 y un valor objetivo de  $10^6$  cargas. Los 10 iones más intensos fueron secuencialmente aislados por fragmentación en la trampa iónica lineal, empleando disociación inducida por colisión (CID), con un valor objetivo de 5000 cargas. En la determinación de los sitios fosforilados, para mejorar la fragmentación de los fosfopéptidos, se activó el algoritmo de pérdida neutral en el software Xcalibur para cada espectro MS/MS. Cuando se detectó una pérdida neutral de 98, 49, o 32,7 Thomson (Th), se aplicó la activación de multi-etapas para fragmentar aún más el ión. Los iones diana seleccionados para MS/MS fueron dinámicamente excluidos durante 90 segundos. Los fragmentos resultantes fueron grabados en el LTQ. Todos los datos fueron obtenidos con el software Xcalibur (Thermo Fisher Scientific).

### *18.3 Análisis de datos*

Los archivos RAW MS de Velos LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) fueron procesados con el software MaxQuant (Cox & Mann, 2008). La identificación de proteínas y péptidos fue llevada a cabo utilizando la base de datos UniProt, versión 4.1, suplementada con 175 contaminantes comúnmente observados. Para buscar masa parental e iones fragmentados, se requirió una desviación máxima inicial de 7 ppm y 0,5 Da, respectivamente. Se seleccionó la tripsina con especificidad enzimática completa y solamente se admitieron péptidos con una longitud mínima de 6 aminoácidos y un máximo de dos cortes omitidos.

La carbamidometilación (Cys) se estableció como modificación fija, mientras que la oxidación (Met), N-acetilación y fosforilación fueron consideradas como modificaciones variables. Para la identificación de proteínas, el índice máximo de falsos positivos fue establecido en 0,01.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aarts, M., Sharpe, R., Garcia-Murillas, I., Gevensleben, H., Hurd, M. S., Shumway, S. D., Toniatti, C., et al. (2012). Forced mitotic entry of S-phase cells as a therapeutic strategy induced by inhibition of WEE1. *Cancer discovery*, 2(6), 524–539. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0320
- Aleem, E., Kiyokawa, H., & Kaldis, P. (2005). Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nature cell biology*, 7(8), 831–836. doi:10.1038/ncb1284
- Aligue, R., Wu, L., & Russell, P. (1997). Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Wee1 tyrosine kinase. *The Journal of biological chemistry*, 272(20), 13320–13325.
- Allen, J. B., Zhou, Z., Siede, W., Friedberg, E. C., & Elledge, S. J. (1994). The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes & Development*, 8(20), 2401–2415.
- Andersen, S. L., Bergstralh, D. T., Kohl, K. P., LaRocque, J. R., Moore, C. B., & Sekelsky, J. (2009). *Drosophila* MUS312 and the vertebrate ortholog BTBD12 interact with DNA structure-specific endonucleases in DNA repair and recombination. *Molecular Cell*, 35(1), 128–135. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.019
- Anglana, M., Apiou, F., Bensimon, A., & Debatisse, M. (2003). Dynamics of DNA Replication in Mammalian Somatic Cells. *Cell*, 114(3), 385–394. doi:10.1016/S0092-8674(03)00569-5
- Arata, Y., Fujita, M., Ohtani, K., Kijima, S., & Kato, J. Y. (2000). Cdk2-dependent and -independent pathways in E2F-mediated S phase induction. *The Journal of biological chemistry*, 275(9), 6337–6345.
- Ashcroft, M., Kubbutat, M. H., & Vousden, K. H. (1999). Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 19(3), 1751–1758.
- Atherton-Fessler, S., Liu, F., Gabrielli, B., Lee, M. S., Peng, C. Y., & Piwnicka-Worms, H. (1994). Cell cycle regulation of the p34cdc2 inhibitory kinases. *Molecular biology of the cell*, 5(9), 989–1001.
- Ayad, N. G., Rankin, S., Murakami, M., Jebanathirajah, J., Gygi, S., & Kirschner, M. W. (2003). Tome-1, a trigger of mitotic entry, is degraded during G1 via the APC. *Cell*, 113(1), 101–113.
- Bahassi, E. M., Myer, D. L., McKenney, R. J., Hennigan, R. F., &

- Stambrook, P. J. (2006). Priming phosphorylation of Chk2 by polo-like kinase 3 (Plk3) mediates its full activation by ATM and a downstream checkpoint in response to DNA damage. *Mutation research*, *596*(1-2), 166–176. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.12.002
- Bailly, A. P., Freeman, A., Hall, J., Déclais, A.-C., Alpi, A., Lilley, D. M. J., Ahmed, S., et al. (2010). The *Caenorhabditis elegans* homolog of Gen1/Yen1 resolvases links DNA damage signaling to DNA double-strand break repair. *PLoS genetics*, *6*(7), e1001025. doi:10.1371/journal.pgen.1001025
- Bao, S., Tibbetts, R. S., Brumbaugh, K. M., Fang, Y., Richardson, D. A., Ali, A., Chen, S. M., et al. (2001). ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature*, *411*(6840), 969–974. doi:10.1038/35082110
- Bartek, J., & Lukas, J. (2001). Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS letters*, *490*(3), 117–122.
- Batista, L. F. Z., Kaina, B., Meneghini, R., & Menck, C. F. M. (2009). How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutation research*, *681*(2-3), 197–208. doi:10.1016/j.mrrev.2008.09.001
- Batty, D. P., & Wood, R. D. (2000). Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene*, *241*(2), 193–204.
- Beck, H., Nahse, V., Larsen, M. S. Y., Groth, P., Clancy, T., Lees, M., Jorgensen, M., et al. (2010). Regulators of cyclin-dependent kinases are crucial for maintaining genome integrity in S phase. *The Journal of cell biology*, *188*(5), 629–638. doi:10.1083/jcb.200905059
- Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Kitagawa, R., Melander, F., Kastan, M. B., Bartek, J., & Lukas, J. (2006). Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *The Journal of cell biology*, *173*(2), 195–206. doi:10.1083/jcb.200510130
- Bjursell, G., & REICHARD, P. (1973). Effects of thymidine on deoxyribonucleoside triphosphate pools and deoxyribonucleic acid synthesis in Chinese hamster ovary cells. *The Journal of biological chemistry*, *248*(11), 3904–3909.
- Boddy, M. N., Gaillard, P. H., McDonald, W. H., Shanahan, P., Yates, J. R., & Russell, P. (2001). Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase. *Cell*, *107*(4), 537–548.
- Boddy, M. N., Lopez-Girona, A., Shanahan, P., Interthal, H., Heyer, W. D.,



- & Russell, P. (2000). Damage tolerance protein Mus81 associates with the FHA1 domain of checkpoint kinase Cds1. *Molecular and Cellular Biology*, 20(23), 8758–8766.
- Bolderson, E., Tomimatsu, N., Richard, D. J., Boucher, D., Kumar, R., Pandita, T. K., Burma, S., et al. (2010). Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, 38(6), 1821–1831. doi:10.1093/nar/gkp1164
- Booher, R. N., Holman, P. S., & Fattaey, A. (1997). Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *The Journal of biological chemistry*, 272(35), 22300–22306.
- Bridges, K. A., Hirai, H., Buser, C. A., Brooks, C., Liu, H., Buchholz, T. A., Molkenkine, J. M., et al. (2011). MK-1775, a novel Wee1 kinase inhibitor, radiosensitizes p53-defective human tumor cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(17), 5638–5648. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0650
- Buermeyer, A. B., Deschenes, S. M., Baker, S. M., & Liskay, R. M. (1999). Mammalian DNA mismatch repair. *Annual review of genetics*, 33, 533–564. doi:10.1146/annurev.genet.33.1.533
- Caillat, C., & Perrakis, A. (2012). Cdt1 and geminin in DNA replication initiation. *Sub-cellular biochemistry*, 62, 71–87. doi:10.1007/978-94-007-4572-8\_5
- Cardozo, T., & Pagano, M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(9), 739–751. doi:10.1038/nrm1471
- Carrassa, L., Chilà, R., Lupi, M., Ricci, F., Celenza, C., Mazzeletti, M., Brogini, M., et al. (2012). Combined inhibition of Chk1 and Wee1: in vitro synergistic effect translates to tumor growth inhibition in vivo. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(13), 2507–2517. doi:10.4161/cc.20899
- Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M., & Halazonetis, T. D. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes & Development*, 14(3), 278–288.
- Chen, J.-G., & Horwitz, S. B. (2002). Differential mitotic responses to microtubule-stabilizing and -destabilizing drugs. *Cancer Research*, 62(7), 1935–1938.

- Chen, X. B., Melchionna, R., Denis, C. M., Gaillard, P. H., Blasina, A., Van de Weyer, I., Boddy, M. N., et al. (2001). Human Mus81-associated endonuclease cleaves Holliday junctions in vitro. *Molecular Cell*, 8(5), 1117–1127.
- Cheng, C. H., & Kuchta, R. D. (1993). DNA polymerase epsilon: aphidicolin inhibition and the relationship between polymerase and exonuclease activity. *Biochemistry*, 32(33), 8568–8574.
- Cheok, C. F., Bachrati, C. Z., Chan, K. L., Ralf, C., Wu, L., & Hickson, I. D. (2005). Roles of the Bloom's syndrome helicase in the maintenance of genome stability. *Biochemical Society transactions*, 33(Pt 6), 1456–1459. doi:10.1042/BST20051456
- Ciccia, A., Constantinou, A., & West, S. C. (2003). Identification and characterization of the human mus81-eme1 endonuclease. *The Journal of biological chemistry*, 278(27), 25172–25178. doi:10.1074/jbc.M302882200
- Ciccia, A., McDonald, N., & West, S. C. (2008). Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins. *Annual review of biochemistry*, 77, 259–287. doi:10.1146/annurev.biochem.77.070306.102408
- Cimprich, K. A., & Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(8), 616–627. doi:10.1038/nrm2450
- Coleman, T. R., & Dunphy, W. G. (1994). Cdc2 regulatory factors. *Current Opinion in Cell Biology*, 6(6), 877–882.
- Cortez, D., Glick, G., & Elledge, S. J. (2004). Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27), 10078–10083. doi:10.1073/pnas.0403410101
- Cortez, D., Wang, Y., Qin, J., & Elledge, S. J. (1999). Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5442), 1162–1166.
- Costanzo, V., Robertson, K., Ying, C. Y., Kim, E., Avvedimento, E., Gottesman, M., Grieco, D., et al. (2000). Reconstitution of an ATM-dependent checkpoint that inhibits chromosomal DNA replication following DNA damage. *Molecular Cell*, 6(3), 649–659.

- Cotta-Ramusino, C., Fachinetti, D., Lucca, C., Doksani, Y., Lopes, M., Sogo, J., & Foiani, M. (2005). Exo1 processes stalled replication forks and counteracts fork reversal in checkpoint-defective cells. *Molecular Cell*, *17*(1), 153–159. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.032
- Cox, J., & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology*, *26*(12), 1367–1372. doi:10.1038/nbt.1511
- D'Arpa, P., Beardmore, C., & Liu, L. F. (1990). Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. *Cancer Research*, *50*(21), 6919–6924.
- Dalal, S. N., Schweitzer, C. M., Gan, J., & DeCaprio, J. A. (1999). Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(6), 4465–4479.
- Davies, K. D., Cable, P. L., Garrus, J. E., Sullivan, F. X., Carlowitz, von, I., Huerou, Y. L., Wallace, E., et al. (2011). Chk1 inhibition and Wee1 inhibition combine synergistically to impede cellular proliferation. *Cancer biology & therapy*, *12*(9), 788–796. doi:10.4161/cbt.12.9.17673
- De Witt Hamer, P. C., Mir, S. E., Noske, D., Van Noorden, C. J. F., & Würdinger, T. (2011). WEE1 kinase targeting combined with DNA-damaging cancer therapy catalyzes mitotic catastrophe. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *17*(13), 4200–4207. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2537
- Dehay, C., & Kennedy, H. (2007). Cell-cycle control and cortical development. *Nature reviews. Neuroscience*, *8*(6), 438–450. doi:10.1038/nrn2097
- Desany, B. A., Alcasabas, A. A., Bachant, J. B., & Elledge, S. J. (1998). Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes & Development*, *12*(18), 2956–2970.
- Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D. H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., et al. (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell*, *136*(3), 435–446. doi:10.1016/j.cell.2008.12.041
- Donzelli, M., & Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalian checkpoints

- through Cdc25 inactivation. *EMBO reports*, 4(7), 671–677. doi:10.1038/sj.embor.embor887
- Dronkert, M. L., & Kanaar, R. (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutation research*, 486(4), 217–247.
- Duursma, A. M., & Cimprich, K. A. (2010). Checkpoint recovery after DNA damage: a rolling stop for CDKs. *EMBO reports*, 11(6), 411–412. doi:10.1038/embor.2010.76
- Elia, A. E. H., Cantley, L. C., & Yaffe, M. B. (2003). Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5610), 1228–1231.
- Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R. G., Bartek, J., & Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, 410(6830), 842–847. doi:10.1038/35071124
- Fattaey, A., & Booher, R. N. (1997). Myt1: a Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. *Progress in cell cycle research*, 3, 233–240.
- Featherstone, C., & Jackson, S. P. (1999). Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutation research*, 434(1), 3–15.
- Featherstone, C., & Russell, P. (1991). Fission yeast p107wee1 mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase. *Nature*, 349(6312), 808–811. doi:10.1038/349808a0
- Fekairi, S., Scaglione, S., Chahwan, C., Taylor, E. R., Tissier, A., Coulon, S., Dong, M.-Q., et al. (2009). Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases. *Cell*, 138(1), 78–89. doi:10.1016/j.cell.2009.06.029
- Forment, J. V., Blasius, M., Guerini, I., & Jackson, S. P. (2011). Structure-Specific DNA Endonuclease Mus81/Eme1 Generates DNA Damage Caused by Chk1 Inactivation. (M. Muzi-Falconi, Ed.) *PLoS ONE*, 6(8), e23517. doi:10.1371/journal.pone.0023517.g003
- Franco, S., Murphy, M. M., Li, G., Borjeson, T., Boboila, C., & Alt, F. W. (2008). DNA-PKcs and Artemis function in the end-joining phase of immunoglobulin heavy chain class switch recombination. *The Journal of experimental medicine*, 205(3), 557–564. doi:10.1084/jem.20080044
- Freire, R., van Vugt, M. A. T. M., Mamely, I., & Medema, R. H. (2006). Claspin: timing the cell cycle arrest when the genome is damaged. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(24), 2831–2834.
- Furuno, N., Elzen, den, N., & Pines, J. (1999). Human cyclin A is required

- for mitosis until mid prophase. *The Journal of cell biology*, 147(2), 295–306.
- Gallo-Fernandez, M., Saugar, I., Ortiz-Bazan, M. A., Vazquez, M. V., & Tercero, J. A. (2012). Cell cycle-dependent regulation of the nuclease activity of Mus81-Eme1/Mms4. *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/gks599
- Garcia, V., Phelps, S. E. L., Gray, S., & Neale, M. J. (2011). Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature*, 479(7372), 241–244. doi:10.1038/nature10515
- Gatei, M., Young, D., Cerosaletti, K. M., Desai-Mehta, A., Spring, K., Kozlov, S., Lavin, M. F., et al. (2000). ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nature genetics*, 25(1), 115–119. doi:10.1038/75508
- Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F., & Kirschner, M. W. (1991). cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell*, 67(1), 197–211.
- Golsteyn, R. M., Mundt, K. E., Fry, A. M., & Nigg, E. A. (1995). Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *The Journal of cell biology*, 129(6), 1617–1628.
- Gould, K. L., & Nurse, P. (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature*, 342(6245), 39–45. doi:10.1038/342039a0
- Griffith, E., Walker, S., Martin, C.-A., Vagnarelli, P., Stiff, T., Vernay, B., Sanna, A., N., et al. (2008). Mutations in pericentrin cause Seckel syndrome with defective ATR-dependent DNA damage signaling. *Nature genetics*, 40(2), 232–236. doi:10.1038/ng.2007.80
- Haber, J. E. (1998). The many interfaces of Mre11. *Cell*, 95(5), 583–586.
- Haese, Den, G. J., Walworth, N., Carr, A. M., & Gould, K. L. (1995). The Wee1 protein kinase regulates T14 phosphorylation of fission yeast Cdc2. *Molecular biology of the cell*, 6(4), 371–385.
- Hanada, K., Budzowska, M., Davies, S. L., van Drunen, E., Onizawa, H., Beverloo, H. B., Maas, A., et al. (2007). The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. *Nature structural & molecular biology*, 14(11), 1096–1104. doi:10.1038/nsmb1313
- Harper, J. W., & Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: ten

- years after. *Molecular Cell*, 28(5), 739–745.  
doi:10.1016/j.molcel.2007.11.015
- Hartwell, L. H., & Kastan, M. B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5192), 1821–1828.
- Harvey, S. L., Charlet, A., Haas, W., Gygi, S. P., & Kellogg, D. R. (2005). Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1. *Cell*, 122(3), 407–420. doi:10.1016/j.cell.2005.05.029
- Hess, M. T., Schwitter, U., Petretta, M., Giese, B., & Naegeli, H. (1997). Bipartite substrate discrimination by human nucleotide excision repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), 6664–6669.
- Hirai, H., Arai, T., Okada, M., Nishibata, T., Kobayashi, M., Sakai, N., Imagaki, K., et al. (2010). MK-1775, a small molecule Wee1 inhibitor, enhances anti-tumor efficacy of various DNA-damaging agents, including 5-fluorouracil. *Cancer biology & therapy*, 9(7), 514–522.
- Hirai, H., Iwasawa, Y., Okada, M., Arai, T., Nishibata, T., Kobayashi, M., Kimura, T., et al. (2009). Small-molecule inhibition of Wee1 kinase by MK-1775 selectively sensitizes p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents. *Molecular cancer therapeutics*, 8(11), 2992–3000. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0463
- Hu, B., Mitra, J., van den Heuvel, S., & Enders, G. H. (2001). S and G2 phase roles for Cdk2 revealed by inducible expression of a dominant-negative mutant in human cells. *Molecular and Cellular Biology*, 21(8), 2755–2766. doi:10.1128/MCB.21.8.2755-2766.2001
- Huang, X., & Darzynkiewicz, Z. (2006). Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation: a reporter of DNA damage. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 314, 73–80. doi:10.1385/1-59259-973-7:073
- Huen, M. S. Y., Grant, R., Manke, I., Minn, K., Yu, X., Yaffe, M. B., & Chen, J. (2007). RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell*, 131(5), 901–914. doi:10.1016/j.cell.2007.09.041
- Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R. A., Gorgoulis, V. G., Zacharatos, P., Petty, T. J., Sheston, E. A., et al. (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature*, 432(7015), 406–411. doi:10.1038/nature03114
- Ibarra, A., Schwob, E., & Méndez, J. (2008). Excess MCM proteins protect

- human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(26), 8956–8961. doi:10.1073/pnas.0803978105
- Ichijima, Y., Sakasai, R., Okita, N., Asahina, K., Mizutani, S., & Teraoka, H. (2005). Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *336*(3), 807–812. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.164
- Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Oguro, M., Nagano, H., & Mano, Y. (1978). Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase-alpha. *Nature*, *275*(5679), 458–460.
- Interthal, H., & Heyer, W. D. (2000). MUS81 encodes a novel helix-hairpin-helix protein involved in the response to UV- and methylation-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & general genetics : MGG*, *263*(5), 812–827.
- Ip, S. C. Y., Rass, U., Blanco, M. G., Flynn, H. R., Skehel, J. M., & West, S. C. (2008). Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature*, *456*(7220), 357–361. doi:10.1038/nature07470
- Izumi, T., Walker, D. H., & Maller, J. L. (1992). Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus cdc25* phosphatase regulate its activity. *Molecular biology of the cell*, *3*(8), 927–939.
- Jackman, M., Kubota, Y., Elzen, den, N., Hagting, A., & Pines, J. (2002). Cyclin A- and cyclin E-Cdk complexes shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *Molecular biology of the cell*, *13*(3), 1030–1045. doi:10.1091/mbc.01-07-0361
- Jackson, S. P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, *23*(5), 687–696.
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, *461*(7267), 1071–1078. doi:10.1038/nature08467
- Jiang, Y., Rabbi, M., Kim, M., Ke, C., Lee, W., Clark, R. L., Mieczkowski, P. A., et al. (2009). UVA generates pyrimidine dimers in DNA directly. *Biophysical journal*, *96*(3), 1151–1158. doi:10.1016/j.bpj.2008.10.030
- Jin, J., Shirogane, T., Xu, L., Nalepa, G., Qin, J., Elledge, S. J., & Harper, J. W. (2003). SCFbeta-TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes & Development*, *17*(24), 3062–

3074.

- Kai, M., Boddy, M. N., Russell, P., & Wang, T. S. F. (2005). Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress. *Genes & Development*, *19*(8), 919–932. doi:10.1101/gad.1304305
- Kai, M., Furuya, K., Paderi, F., Carr, A. M., & Wang, T. S. F. (2007). Rad3-dependent phosphorylation of the checkpoint clamp regulates repair-pathway choice. *Nature cell biology*, *9*(6), 691–697. doi:10.1038/ncb1600
- Kanemori, Y., Uto, K., & Sagata, N. (2005). Beta-TrCP recognizes a previously undescribed nonphosphorylated destruction motif in Cdc25A and Cdc25B phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(18), 6279–6284. doi:10.1073/pnas.0501873102
- Kastan, M. B., & Lim, D. S. (2000). The many substrates and functions of ATM. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *1*(3), 179–186. doi:10.1038/35043058
- Katou, Y., Kanoh, Y., Bando, M., Noguchi, H., Tanaka, H., Ashikari, T., Sugimoto, K., et al. (2003). S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex. *Nature*, *424*(6952), 1078–1083. doi:10.1038/nature01900
- Khanna, K. K., & Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature genetics*, *27*(3), 247–254. doi:10.1038/85798
- Kim, H., Chen, J., & Yu, X. (2007). Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response. *Science (New York, N.Y.)*, *316*(5828), 1202–1205. doi:10.1126/science.1139621
- Kim, S. Y., & Ferrell, J. E. (2007). Substrate competition as a source of ultrasensitivity in the inactivation of Wee1. *Cell*, *128*(6), 1133–1145. doi:10.1016/j.cell.2007.01.039
- Kim, S. Y., Song, E. J., Lee, K.-J., & Ferrell, J. E. (2005). Multisite M-phase phosphorylation of *Xenopus* Wee1A. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(23), 10580–10590. doi:10.1128/MCB.25.23.10580-10590.2005
- Kogoma, T. (1997). Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, *61*(2), 212–238.



- Kolas, N. K., Chapman, J. R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F. D., Panier, S., et al. (2007). Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science (New York, N.Y.)*, *318*(5856), 1637–1640. doi:10.1126/science.1150034
- Kreahling, J. M., Gemmer, J. Y., Reed, D., Letson, D., Bui, M., & Altioik, S. (2012). MK1775, a selective Wee1 inhibitor, shows single-agent antitumor activity against sarcoma cells. *Molecular cancer therapeutics*, *11*(1), 174–182. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0529
- Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., & Zhao, X. (2012). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Research*, *40*(13), 5795–5818. doi:10.1093/nar/gks270
- Krek, W., & Nigg, E. A. (1991). Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *The EMBO journal*, *10*(2), 305–316.
- Kumagai, A., & Dunphy, W. G. (1992). Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell*, *70*(1), 139–151.
- Kumagai, A., & Dunphy, W. G. (1996). Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science (New York, N.Y.)*, *273*(5280), 1377–1380.
- Kumagai, A., & Dunphy, W. G. (1999). Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes & Development*, *13*(9), 1067–1072.
- Le Page, F., Randrianarison, V., Marot, D., Cabannes, J., Perricaudet, M., Feunteun, J., & Sarasin, A. (2000). BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. *Cancer Research*, *60*(19), 5548–5552.
- Lee, J., Kumagai, A., & Dunphy, W. G. (2001). Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins. *Molecular biology of the cell*, *12*(3), 551–563.
- Li, C., Andrade, M., Dunbrack, R., & Enders, G. H. (2010). A bifunctional regulatory element in human somatic Wee1 mediates cyclin A/Cdk2 binding and Crml-dependent nuclear export. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(1), 116–130. doi:10.1128/MCB.01876-08
- Li, S., Ting, N. S., Zheng, L., Chen, P. L., Ziv, Y., Shiloh, Y., Lee, E. Y., et al. (2000). Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature*, *406*(6792), 210–215.

doi:10.1038/35018134

- Lieber, M. R., Gu, J., Lu, H., Shimazaki, N., & Tsai, A. G. (2010). Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. *Sub-cellular biochemistry*, *50*, 279–296. doi:10.1007/978-90-481-3471-7\_14
- Lim, D. S., Kim, S. T., Xu, B., Maser, R. S., Lin, J., Petrini, J. H., & Kastan, M. B. (2000). ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*, *404*(6778), 613–617. doi:10.1038/35007091
- Little, J. B. (1968). Cellular effects of ionizing radiation. *The New England journal of medicine*, *278*(7), 369–76 concl. doi:10.1056/NEJM196802152780705
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pelliccioli, A., Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C. S., et al. (2001). The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature*, *412*(6846), 557–561. doi:10.1038/35087613
- Lou, Z., Chini, C. C. S., Minter-Dykhouse, K., & Chen, J. (2003). Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 regulates BRCA1 localization and phosphorylation in DNA damage checkpoint control. *The Journal of biological chemistry*, *278*(16), 13599–13602. doi:10.1074/jbc.C300060200
- López-Contreras, A. J., & Fernandez-Capetillo, O. (2010). The ATR barrier to replication-born DNA damage. *DNA Repair*, *9*(12), 1249–1255. doi:10.1016/j.dnarep.2010.09.012
- Lukas, C., Melander, F., Stucki, M., Falck, J., Bekker-Jensen, S., Goldberg, M., Lerenthal, Y., et al. (2004). Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *The EMBO journal*, *23*(13), 2674–2683. doi:10.1038/sj.emboj.7600269
- Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M., & Beach, D. (1991). mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell*, *64*(6), 1111–1122.
- Ma, C. X., Janetka, J. W., & Piwnica-Worms, H. (2011). Death by releasing the breaks: CHK1 inhibitors as cancer therapeutics. *Trends in molecular medicine*, *17*(2), 88–96. doi:10.1016/j.molmed.2010.10.009
- Macurek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M. A., Klompaker, R., Freire, R., Clouin, C., et al. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by

- aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature*, 455(7209), 119–123. doi:10.1038/nature07185
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., & Lukas, J. (2006). Destruction of Claspin by SCFbetaTrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *Molecular Cell*, 23(3), 307–318. doi:10.1016/j.molcel.2006.06.016
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., & Lukas, J. (2007). RNF8 Ubiquitylates Histones at DNA Double-Strand Breaks and Promotes Assembly of Repair Proteins. *Cell*, 131(5), 887–900. doi:10.1016/j.cell.2007.09.040
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R. G., Welcker, M., Bartek, J., & Lukas, J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5470), 1425–1429.
- Mailand, N., Podtelejnikov, A. V., Groth, A., Mann, M., Bartek, J., & Lukas, J. (2002). Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *The EMBO journal*, 21(21), 5911–5920.
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(11), 630–641. doi:10.1016/j.tibs.2005.09.005
- Mamely, I., van Vugt, M. A., Smits, V. A. J., Semples, J. I., Lemmens, B., Perrakis, A., Medema, R. H., et al. (2006). Polo-like kinase-1 controls proteasome-dependent degradation of Claspin during checkpoint recovery. *Current biology : CB*, 16(19), 1950–1955. doi:10.1016/j.cub.2006.08.026
- Mankouri, H. W., & Hickson, I. D. (2007). The RecQ helicase-topoisomerase III-Rmi1 complex: a DNA structure-specific 'dissolvasome'? *Trends in Biochemical Sciences*, 32(12), 538–546. doi:10.1016/j.tibs.2007.09.009
- Marti, T. M., Hefner, E., Feeney, L., Natale, V., & Cleaver, J. E. (2006). H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), 9891–9896. doi:10.1073/pnas.0603779103
- Marti, T. M., Kunz, C., & Fleck, O. (2002). DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *Journal of cellular physiology*, 191(1), 28–41. doi:10.1002/jcp.10077

- Matos, J., Blanco, M. G., Maslen, S., Skehel, J. M., & West, S. C. (2011). Regulatory Control of the Resolution of DNA Recombination Intermediates during Meiosis and Mitosis. *Cell*, *147*(1), 158–172. doi:10.1016/j.cell.2011.08.032
- Matsumoto, Y., Kim, K., & Bogenhagen, D. F. (1994). Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(9), 6187–6197.
- Matsuoka, S., Huang, M., & Elledge, S. J. (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science (New York, N.Y.)*, *282*(5395), 1893–1897.
- Maya-Mendoza, A., Petermann, E., Gillespie, D. A. F., Caldecott, K. W., & Jackson, D. A. (2007). Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. *The EMBO journal*, *26*(11), 2719–2731. doi:10.1038/sj.emboj.7601714
- McGowan, C. H., & Russell, P. (1995). Cell cycle regulation of human WEE1. *The EMBO journal*, *14*(10), 2166–2175.
- McMillan, J. N., Theesfeld, C. L., Harrison, J. C., Bardes, E. S. G., & Lew, D. J. (2002). Determinants of Swp1p degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, *13*(10), 3560–3575. doi:10.1091/mbc.E02-05-0283
- Medema, R. H., & Macûrek, L. (2012). Checkpoint control and cancer. *Oncogene*, *31*(21), 2601–2613. doi:10.1038/onc.2011.451
- Memisoglu, A., & Samson, L. (2000). Base excision repair in yeast and mammals. *Mutation research*, *451*(1-2), 39–51.
- Méndez, J., & Stillman, B. (2000). Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(22), 8602–8612.
- Michael, W. M., & Newport, J. (1998). Coupling of mitosis to the completion of S phase through Cdc34-mediated degradation of Wee1. *Science (New York, N.Y.)*, *282*(5395), 1886–1889.
- Mimitou, E. P., & Symington, L. S. (2009). Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends in Biochemical Sciences*, *34*(5), 264–272. doi:10.1016/j.tibs.2009.01.010
- MORRIS, N. R., & FISCHER, G. A. (1960). Studies concerning inhibition of the synthesis of deoxycytidine by phosphorylated derivatives of

- thymidine. *Biochimica et biophysica acta*, 42, 183–184.
- Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., et al. (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell*, 105(2), 177–186.
- Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A., & Dunphy, W. G. (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5233), 86–90.
- Muñoz, I. M., Hain, K., Déclais, A.-C., Gardiner, M., Toh, G. W., Sanchez-Pulido, L., Heuckmann, J. M., et al. (2009). Coordination of structure-specific nucleases by human SLX4/BTBD12 is required for DNA repair. *Molecular Cell*, 35(1), 116–127. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.020
- Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, 116(2), 221–234.
- Murrow, L. M., Garimella, S. V., Jones, T. L., Caplen, N. J., & Lipkowitz, S. (2009). Identification of WEE1 as a potential molecular target in cancer cells by RNAi screening of the human tyrosine kinome. *Breast Cancer Research and Treatment*, 122(2), 347–357. doi:10.1007/s10549-009-0571-2
- Müller, D., Bouchard, C., Rudolph, B., Steiner, P., Stuckmann, I., Saffrich, R., Ansorge, W., et al. (1997). Cdk2-dependent phosphorylation of p27 facilitates its Myc-induced release from cyclin E/cdk2 complexes. *Oncogene*, 15(21), 2561–2576. doi:10.1038/sj.onc.1201440
- Myers, J. S., & Cortez, D. (2006). Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. *The Journal of biological chemistry*, 281(14), 9346–9350. doi:10.1074/jbc.M513265200
- Norbury, C., Blow, J., & Nurse, P. (1991). Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *The EMBO journal*, 10(11), 3321–3329.
- Nurse, P. (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*, 256(5518), 547–551.
- Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, 344(6266), 503–508. doi:10.1038/344503a0
- Nurse, P., & Thuriaux, P. (1980). Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 96(3), 627–

637.

- O'Connell, M. J., Raleigh, J. M., Verkade, H. M., & Nurse, P. (1997). Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *The EMBO journal*, *16*(3), 545–554. doi:10.1093/emboj/16.3.545
- O'Driscoll, M., Gennery, A. R., Seidel, J., Concannon, P., & Jeggo, P. A. (2004). An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA Repair*, *3*(8-9), 1227–1235. doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.025
- O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V. L., Woods, C. G., Jeggo, P. A., & Goodship, J. A. (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nature genetics*, *33*(4), 497–501. doi:10.1038/ng1129
- Ortega, S., Prieto, I., Odajima, J., Martin, A., Dubus, P., Sotillo, R., Barbero, J. L., et al. (2003). Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nature genetics*, *35*(1), 25–31.
- Parker, L. L., & Piwnica-Worms, H. (1992). Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science (New York, N.Y.)*, *257*(5078), 1955–1957.
- Parker, L. L., Sylvestre, P. J., Byrnes, M. J., Liu, F., & Piwnica-Worms, H. (1995). Identification of a 95-kDa WEE1-like tyrosine kinase in HeLa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(21), 9638–9642.
- Pascucci, B., D'Errico, M., Parlanti, E., Giovannini, S., & Dogliotti, E. (2011). Role of nucleotide excision repair proteins in oxidative DNA damage repair: an updating. *Biochemistry. Biokhimiia*, *76*(1), 4–15.
- Paulsen, R. D., & Cimprich, K. A. (2007). The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair*, *6*(7), 953–966. doi:10.1016/j.dnarep.2007.02.015
- Payne, M., & Hickson, I. D. (2009). Genomic instability and cancer: lessons from analysis of Bloom's syndrome. *Biochemical Society transactions*, *37*(Pt 3), 553–559. doi:10.1042/BST0370553
- Peschiarioli, A., Dorrello, N. V., Guardavaccaro, D., Venere, M., Halazonetis, T., Sherman, N. E., & Pagano, M. (2006). SCFbetaTrCP-mediated degradation of Claspin regulates recovery from the DNA replication checkpoint response. *Molecular Cell*, *23*(3), 319–329. doi:10.1016/j.molcel.2006.06.013

- Petermann, E., Maya-Mendoza, A., Zachos, G., Gillespie, D. A. F., Jackson, D. A., & Caldecott, K. W. (2006). Chk1 Requirement for High Global Rates of Replication Fork Progression during Normal Vertebrate S Phase. *Molecular and Cellular Biology*, 26(8), 3319–3326. doi:10.1128/MCB.26.8.3319-3326.2006
- Petermann, E., Woodcock, M., & Helleday, T. (2010). Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), 16090–16095. doi:10.1073/pnas.1005031107
- Peters, J.-M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Molecular Cell*, 9(5), 931–943.
- Petrini, J. H. (2000). The Mre11 complex and ATM: collaborating to navigate S phase. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(3), 293–296.
- Poirier, M. C. (2004). Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nature reviews. Cancer*, 4(8), 630–637. doi:10.1038/nrc1410
- Pomerening, J. R., Kim, S. Y., & Ferrell, J. E. (2005). Systems-level dissection of the cell-cycle oscillator: bypassing positive feedback produces damped oscillations. *Cell*, 122(4), 565–578. doi:10.1016/j.cell.2005.06.016
- Pomerening, J. R., Sontag, E. D., & Ferrell, J. E. (2003). Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of Cdc2. *Nature cell biology*, 5(4), 346–351. doi:10.1038/ncb954
- Powell, S. N., & Kachnic, L. A. (2003). Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation. *Oncogene*, 22(37), 5784–5791. doi:10.1038/sj.onc.1206678
- Quignon, F., Rozier, L., Lachages, A.-M., Bieth, A., Simili, M., & Debatisse, M. (2006). Sustained mitotic block elicits DNA breaks: one-step alteration of ploidy and chromosome integrity in mammalian cells. *Oncogene*, 26(2), 165–172. doi:10.1038/sj.onc.1209787
- Rappsilber, J., Ishihama, Y., & Mann, M. (2003). Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Analytical chemistry*, 75(3), 663–670.
- Rass, U., Compton, S. A., Matos, J., Singleton, M. R., Ip, S. C. Y., Blanco, M. G., Griffith, J. D., et al. (2010). Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein. *Genes & development*, 24(14),

1559–1569. doi:10.1101/gad.585310

- Rendtlew Danielsen, J. M., Larsen, D. H., Schou, K. B., Freire, R., Falck, J., Bartek, J., & Lukas, J. (2009). HCLK2 is required for activity of the DNA damage response kinase ATR. *The Journal of biological chemistry*, *284*(7), 4140–4147. doi:10.1074/jbc.M808174200
- Russell, P., & Nurse, P. (1987). Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*, *49*(4), 559–567.
- Ryan, K. M., Phillips, A. C., & Vousden, K. H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current Opinion in Cell Biology*, *13*(3), 332–337.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Kang, T.-H., Reardon, J. T., Lee, J. H., & Ozturk, N. (2010). Circadian clock control of the cellular response to DNA damage. *FEBS letters*, *584*(12), 2618–2625. doi:10.1016/j.febslet.2010.03.017
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnicka-Worms, H., & Elledge, S. J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science (New York, N.Y.)*, *277*(5331), 1497–1501.
- Santocanale, C., & Diffley, J. F. (1998). A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature*, *395*(6702), 615–618. doi:10.1038/27001
- Santocanale, C., Sharma, K., & Diffley, J. F. (1999). Activation of dormant origins of DNA replication in budding yeast. *Genes & Development*, *13*(18), 2360–2364.
- Sartori, A. A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., et al. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, *450*(7169), 509–514. doi:10.1038/nature06337
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D. A., et al. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science (New York, N.Y.)*, *268*(5218), 1749–1753.
- Schwartz, E. K., & Heyer, W.-D. (2011). Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. *Chromosoma*, *120*(2), 109–127. doi:10.1007/s00412-010-0304-7
- Sclafani, R. A., & Holzen, T. M. (2007). Cell cycle regulation of DNA



- replication. *Annual review of genetics*, 41, 237–280.  
doi:10.1146/annurev.genet.41.110306.130308
- Scorah, J., & McGowan, C. H. (2009). Claspin and Chk1 regulate replication fork stability by different mechanisms. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(7), 1036–1043.
- Segurado, M., & Diffley, J. F. X. (2008). Separate roles for the DNA damage checkpoint protein kinases in stabilizing DNA replication forks. *Genes & Development*, 22(13), 1816–1827.  
doi:10.1101/gad.477208
- Semple, J. I., Smits, V. A. J., Fernaud, J.-R., Mamely, I., & Freire, R. (2007). Cleavage and degradation of Claspin during apoptosis by caspases and the proteasome. *Cell Death and Differentiation*, 14(8), 1433–1442. doi:10.1038/sj.cdd.4402134
- Sharma, S., Sommers, J. A., & Brosh, R. M. (2008). Processing of DNA replication and repair intermediates by the concerted action of RecQ helicases and Rad2 structure-specific nucleases. *Protein and peptide letters*, 15(1), 89–102.
- Shechter, D., Costanzo, V., & Gautier, J. (2004). ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nature cell biology*, 6(7), 648–655. doi:10.1038/ncb1145
- Shell, S. M., Li, Z., Shkriabai, N., Kvaratskhelia, M., Brosey, C., Serrano, M. A., Chazin, W. J., et al. (2009). Checkpoint kinase ATR promotes nucleotide excision repair of UV-induced DNA damage via physical interaction with xeroderma pigmentosum group A. *The Journal of biological chemistry*, 284(36), 24213–24222.  
doi:10.1074/jbc.M109.000745
- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*, 13(12), 1501–1512.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*, 1(6), 2856–2860.  
doi:10.1038/nprot.2006.468
- Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., & Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes & Development*, 14(3), 289–300.

- Shiloh, Y. (2001). ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Current opinion in genetics & development*, 11(1), 71–77.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature reviews. Cancer*, 3(3), 155–168. doi:10.1038/nrc1011
- Shirahige, K., Hori, Y., Shiraishi, K., Yamashita, M., Takahashi, K., Obuse, C., Tsurimoto, T., et al. (1998). Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression. *Nature*, 395(6702), 618–621. doi:10.1038/27007
- Sinha, R. P., & Häder, D. P. (2002). UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 1(4), 225–236.
- Smits, V. A. J., Reaper, P. M., & Jackson, S. P. (2006). Rapid PIKK-Dependent Release of Chk1 from Chromatin Promotes the DNA-Damage Checkpoint Response. *Current Biology*, 16(2), 150–159. doi:10.1016/j.cub.2005.11.066
- Snyder, M., He, W., & Zhang, J. J. (2005). The DNA replication factor MCM5 is essential for Stat1-mediated transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), 14539–14544. doi:10.1073/pnas.0507479102
- Sobhian, B., Shao, G., Lilli, D. R., Culhane, A. C., Moreau, L. A., Xia, B., Livingston, D. M., et al. (2007). RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5828), 1198–1202. doi:10.1126/science.1139516
- Somasundaram, K. (2003). Breast cancer gene 1 (BRCA1): role in cell cycle regulation and DNA repair--perhaps through transcription. *Journal of cellular biochemistry*, 88(6), 1084–1091. doi:10.1002/jcb.10469
- Sonoda, E., Takata, M., Yamashita, Y. M., Morrison, C., & Takeda, S. (2001). Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), 8388–8394.
- Sowa, M., Arthurs, B. J., Estes, B. J., & Morgan, W. F. (2006). Effects of ionizing radiation on cellular structures, induced instability and carcinogenesis. *EXS*, (96), 293–301.
- Stewart, G. S., Panier, S., Townsend, K., Al-Hakim, A. K., Kolas, N. K., Miller, E. S., Nakada, S., et al. (2009). The RIDDLE syndrome protein

- mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell*, 136(3), 420–434. doi:10.1016/j.cell.2008.12.042
- Stewart, G. S., Wang, B., Bignell, C. R., Taylor, A. M. R., & Elledge, S. J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature*, 421(6926), 961–966. doi:10.1038/nature01446
- Strouse, J. J., & Heeney, M. M. (2012). Hydroxyurea for the treatment of sickle cell disease: Efficacy, barriers, toxicity, and management in children. *Pediatric blood & cancer*, 59(2), 365–371. doi:10.1002/pbc.24178
- Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J., & Jackson, S. P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, 123(7), 1213–1226. doi:10.1016/j.cell.2005.09.038
- Svendsen, J. M., Smogorzewska, A., Sowa, M. E., O'Connell, B. C., Gygi, S. P., Elledge, S. J., & Harper, J. W. (2009). Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. *Cell*, 138(1), 63–77. doi:10.1016/j.cell.2009.06.030
- Syljuasen, R. G., Sorensen, C. S., Hansen, L. T., Fugger, K., Lundin, C., Johansson, F., Helleday, T., et al. (2005). Inhibition of Human Chk1 Causes Increased Initiation of DNA Replication, Phosphorylation of ATR Targets, and DNA Breakage. *Molecular and Cellular Biology*, 25(9), 3553–3562. doi:10.1128/MCB.25.9.3553-3562.2005
- Szyjka, S. J., Aparicio, J. G., Viggiani, C. J., Knott, S., Xu, W., Tavaré, S., & Aparicio, O. M. (2008). Rad53 regulates replication fork restart after DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, 22(14), 1906–1920. doi:10.1101/gad.1660408
- Sørensen, C. S., Syljuåsen, R. G., Lukas, J., & Bartek, J. (2004). ATR, Claspin and the Rad9-Rad1-Hus1 complex regulate Chk1 and Cdc25A in the absence of DNA damage. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 3(7), 941–945.
- Taylor, E. R., & McGowan, C. H. (2008). Cleavage mechanism of human Mus81-Eme1 acting on Holliday-junction structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), 3757–3762. doi:10.1073/pnas.0710291105
- Taylor, W. R., & Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20(15), 1803–1815. doi:10.1038/sj.onc.1204252
- Tercero, J. A., & Diffley, J. F. (2001). Regulation of DNA replication fork

- progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature*, 412(6846), 553–557. doi:10.1038/35087607
- Thuriaux, P., Nurse, P., & Carter, B. (1978). Mutants altered in the control co-ordinating cell division with cell growth in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular & general genetics : MGG*, 161(2), 215–220.
- Tomimatsu, N., Mukherjee, B., Deland, K., Kurimasa, A., Bolderson, E., Khanna, K. K., & Burma, S. (2012). Exo1 plays a major role in DNA end resection in humans and influences double-strand break repair and damage signaling decisions. *DNA Repair*, 11(4), 441–448. doi:10.1016/j.dnarep.2012.01.006
- Toueille, M. (2004). The human Rad9/Rad1/Hus1 damage sensor clamp interacts with DNA polymerase and increases its DNA substrate utilisation efficiency: implications for DNA repair. *Nucleic Acids Research*, 32(11), 3316–3324. doi:10.1093/nar/gkh652
- Tsao, C.-C., Geisen, C., & Abraham, R. T. (2004). Interaction between human MCM7 and Rad17 proteins is required for replication checkpoint signaling. *The EMBO journal*, 23(23), 4660–4669. doi:10.1038/sj.emboj.7600463
- Tsou, M.-F. B., & Stearns, T. (2006). Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature*, 442(7105), 947–951. doi:10.1038/nature04985
- Ubersax, J. A., Woodbury, E. L., Quang, P. N., Paraz, M., Blethrow, J. D., Shah, K., Shokat, K. M., et al. (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature*, 425(6960), 859–864. doi:10.1038/nature02062
- Van Horn, R. D., Chu, S., Fan, L., Yin, T., Du, J., Beckmann, R., Mader, M., et al. (2010). Cdk1 activity is required for mitotic activation of aurora A during G2/M transition of human cells. *The Journal of biological chemistry*, 285(28), 21849–21857. doi:10.1074/jbc.M110.141010
- van Vugt, M. A. T. M., Bras, A., & Medema, R. H. (2004). Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. *Molecular Cell*, 15(5), 799–811.
- Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000, November 16). Surfing the p53 network. *Nature*, pp. 307–310. doi:10.1038/35042675
- Walter, J., & Newport, J. (2000). Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA,

- and DNA polymerase alpha. *Molecular Cell*, 5(4), 617–627.
- Wang, B., Matsuoka, S., Ballif, B. A., Zhang, D., Smogorzewska, A., Gygi, S. P., & Elledge, S. J. (2007). Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5828), 1194–1198. doi:10.1126/science.1139476
- Wang, X., Peterson, C. A., Zheng, H., Nairn, R. S., Legerski, R. J., & Li, L. (2001). Involvement of nucleotide excision repair in a recombination-independent and error-prone pathway of DNA interstrand cross-link repair. *Molecular and Cellular Biology*, 21(3), 713–720. doi:10.1128/MCB.21.3.713-720.2001
- Wang, X., Zou, L., Lu, T., Bao, S., Hurov, K. E., Hittelman, W. N., Elledge, S. J., et al. (2006). Rad17 phosphorylation is required for claspin recruitment and Chk1 activation in response to replication stress. *Molecular Cell*, 23(3), 331–341. doi:10.1016/j.molcel.2006.06.022
- Wang, Y., Jacobs, C., Hook, K. E., Duan, H., Booher, R. N., & Sun, Y. (2000). Binding of 14-3-3beta to the carboxyl terminus of Wee1 increases Wee1 stability, kinase activity, and G2-M cell population. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 11(4), 211–219.
- Watanabe, N., Arai, H., Iwasaki, J.-I., Shiina, M., Ogata, K., Hunter, T., & Osada, H. (2005). Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(33), 11663–11668. doi:10.1073/pnas.0500410102
- Watanabe, N., Arai, H., Nishihara, Y., Taniguchi, M., Watanabe, N., Hunter, T., & Osada, H. (2004). M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), 4419–4424. doi:10.1073/pnas.0307700101
- Watanabe, N., Broome, M., & Hunter, T. (1995). Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *The EMBO journal*, 14(9), 1878–1891.
- Wechsler, T., Newman, S., & West, S. C. (2011). Aberrant chromosome morphology in human cells defective for Holliday junction resolution. *Nature*, 471(7340), 642–646. doi:10.1038/nature09790
- Wiebusch, L., Uecker, R., & Hagemeyer, C. (2003). Human

- cytomegalovirus prevents replication licensing by inhibiting MCM loading onto chromatin. *EMBO reports*, 4(1), 42–46.
- Wroble, B. N., Finkielstein, C. V., & Sible, J. C. (2007). Wee1 kinase alters cyclin E/Cdk2 and promotes apoptosis during the early embryonic development of *Xenopus laevis*. *BMC developmental biology*, 7, 119. doi:10.1186/1471-213X-7-119
- Wu, C. L., Kirley, S. D., Xiao, H., Chuang, Y., Chung, D. C., & Zukerberg, L. R. (2001). Cables enhances cdk2 tyrosine 15 phosphorylation by Wee1, inhibits cell growth, and is lost in many human colon and squamous cancers. *Cancer Research*, 61(19), 7325–7332.
- Wu, J., Lu, L.-Y., & Yu, X. (2010). The role of BRCA1 in DNA damage response. *Protein & Cell*, 1(2), 117–123. doi:10.1007/s13238-010-0010-5
- Wu, L., & Hickson, I. D. (2003). The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*, 426(6968), 870–874.
- Wu, X., Ranganathan, V., Weisman, D. S., Heine, W. F., Ciccone, D. N., O'Neill, T. B., Crick, K. E., et al. (2000). ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature*, 405(6785), 477–482. doi:10.1038/35013089
- Wu, X., Wilson, T. E., & Lieber, M. R. (1999). A role for FEN-1 in nonhomologous DNA end joining: the order of strand annealing and nucleolytic processing events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(4), 1303–1308.
- Yamada, K., & Itoh, R. (1994). Involvement of DNA polymerase delta and/or epsilon in joining UV-induced DNA single strand breaks in human fibroblasts (comparison of effects of butylphenyldeoxyguanosine with aphidicolin). *Biochimica et biophysica acta*, 1219(2), 302–306.
- Yan, J., Kim, Y.-S., Yang, X.-P., Li, L.-P., Liao, G., Xia, F., & Jetten, A. M. (2007). The ubiquitin-interacting motif containing protein RAP80 interacts with BRCA1 and functions in DNA damage repair response. *Cancer Research*, 67(14), 6647–6656. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0924
- Yarbro, J. W. (1992). Mechanism of action of hydroxyurea. *Seminars in oncology*, 19(3 Suppl 9), 1–10.
- You, Z., Chahwan, C., Bailis, J., Hunter, T., & Russell, P. (2005). ATM

- activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Molecular and Cellular Biology*, 25(13), 5363–5379. doi:10.1128/MCB.25.13.5363-5379.2005
- Zhan, Q., Antinore, M. J., Wang, X. W., Carrier, F., Smith, M. L., Harris, C. C., & Fornace, A. J. J. (1999). Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene*, 18(18), 2892–2900. doi:10.1038/sj.onc.1202667
- Zhang, G., Gibbs, E., Kelman, Z., O'Donnell, M., & Hurwitz, J. (1999). Studies on the interactions between human replication factor C and human proliferating cell nuclear antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), 1869–1874.
- Zhang, Y., & Xiong, Y. (2001). A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5523), 1910–1915. doi:10.1126/science.1058637
- Zhao, S., Weng, Y. C., Yuan, S. S., Lin, Y. T., Hsu, H. C., Lin, S. C., Gerbino, E., et al. (2000). Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature*, 405(6785), 473–477. doi:10.1038/35013083
- Zhou, B. B., & Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408(6811), 433–439. doi:10.1038/35044005
- Zielke, N., Querings, S., Rottig, C., Lehner, C., & Sprenger, F. (2008). The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is required for rereplication control in endoreplication cycles. *Genes & Development*, 22(12), 1690–1703. doi:10.1101/gad.469108
- Zou, L., & Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5625), 1542–1548. doi:10.1126/science.1083430
- Zou, L., & Stillman, B. (1998). Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5363), 593–596.