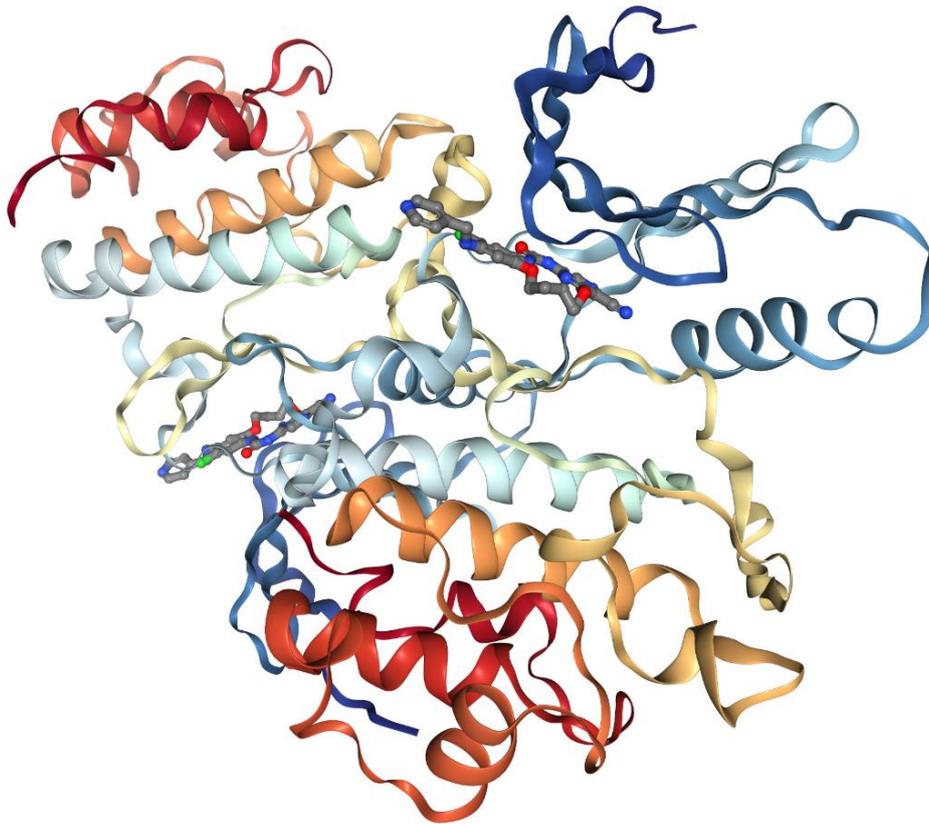


Mecanismo de degradación de la quinasa CHK1 activa a través del proteasoma

Mechanism of degradation of active CHK1 kinase through the proteasome



Trabajo de Fin de Grado
Ángel Mora Rodríguez

Tutores:

Dr. David Alexander Forsyth Gillespie & Dra. Teresa Acosta Almeida

Índice

Resumen	1
Abstract	1
Introducción	2
El papel de CHK1 en el ciclo celular	2
La activación de la respuesta y los mecanismos de reparación del genoma	6
Estructura y auto inhibición	8
Regulación ligada a ubiquitina	10
Objetivos	12
Material y Métodos	13
Cultivos celulares	13
Creación de las líneas DT40 CHK1-WT, CHK1-L393P, CHK1-B3 y CHK1-B5	14
Tratamientos	15
Extractos celulares	15
Cuantificación de proteínas	16
Western Blot	16
Electroforesis	17
Transferencia	18
Inmunodetección	18
Normalización de proteínas	19
Resultados y Discusión	20
Conclusiones	25
Conclusions	25
Bibliografía	26

Resumen

La quinasa de punto de control 1 (CHK1) es una quinasa con importantes funciones en la regulación del ciclo celular, desempeñando un papel de particular importancia en la respuesta al daño en el ADN. Su activación vía fosforilación mediada por ATR previene a las células de la entrada en mitosis aumentando la fosforilación inhibitoria de CDK1. Dicha actividad está regulada negativamente por un dominio asociado a quinasa 1 (KAI) situado en el extremo C-terminal de CHK1, que consta de 2 hélices alfa y 5 láminas beta. Los mutantes de CHK1 que involucran la desestabilización de cualquiera de las hélices alfa mediante la inserción de residuos de prolina (L393P y F455P) son constitutivamente activos y están sujetos a una degradación proteosómica muy rápida, probablemente como resultado de la exposición de una secuencia degrón.

En este trabajo nos centramos en la relación entre los cambios estructurales asociados a la activación de CHK1 y la estabilidad de la proteína, usando mutantes de las láminas beta. Mostramos que las mutaciones no sinónimas en beta 3 y 5 (B3 y B5) dan lugar a formas constitutivamente activas de CHK1 no sujetas a una degradación proteosómica rápida. Estos datos indican que las consecuencias estructurales y el mecanismo de activación de CHK1 producidos por la desestabilización de las hélices alfa del dominio KA1 y los producidos por las mutaciones de las láminas beta son distintas.

Abstract

CHK1 is a kinase with important functions in the regulation of the cell cycle, playing a particularly important role in the response to DNA damage. CHK1 activation via ATR-mediated phosphorylation prevents cells from entering mitosis by increasing inhibitory phosphorylation of CDK1. Such activity is negatively regulated by a kinase one-associated domain (KA1) located at the C-terminus of CHK1 and consists of two alpha helices and 5 beta sheets. CHK1 mutants with destabilization of either alpha-helix through insertion of proline residues (L393P and F455P) are constitutively active and subject to very rapid proteosomal degradation, probably as a result of exposure of a degron sequence.

In this work we focus on the relationship between the structural changes associated with CHK1 activation and protein stability using beta sheet mutants. We show that non-

synonymous mutations in beta sheets 3 and 5 (B3 and B5) give rise to constitutively active forms of CHK1 that are not subject to rapid proteosomal degradation. These data indicate that the structural consequences and the activation mechanism of CHK1 produced by KA1 domain helix-disruption and those produced by beta-sheet mutations are different.

Introducción

El papel de CHK1 en el ciclo celular

La quinasa de punto de control 1 (CHK1) es una quinasa de serina/treonina necesaria para la supervivencia celular y el mantenimiento de la estabilidad genómica en células de vertebrados, siendo uno de los elementos constitutivos de los puntos de control del ciclo celular (PCC). Su actividad es esencial tanto en células embrionarias como en la mayoría de células somáticas proliferativas (Liu Q *et al.*, 2000; Zachos *et al.*, 2003) y si bien parece ser usualmente requerida para una división celular exitosa en ciclos no perturbados, destaca por su respuesta en condiciones de daño en el genoma o de estrés replicativo. El daño al ADN, principalmente en forma de roturas de doble cadena, o la inhibición de su replicación, desencadenan múltiples respuestas de PCC mecánicamente distintas. El daño del ADN provoca detenciones del ciclo celular en los puntos de control de la fase G1 y de la fase G2, que impiden la replicación o segregación del genoma dañado respectivamente. Además, la velocidad a la que se replica el ADN dañado en las células en fase S se ralentiza (punto de control intra-S). La inhibición de su síntesis, por otro lado, desencadena respuestas que mantienen la viabilidad de las horquillas de replicación estancadas, evitan la formación de nuevas horquillas y bloquean la entrada a la mitosis hasta que se completa la duplicación del genoma (punto de control S-M). CHK1 es un efector clave en todas estas respuestas con la excepción del punto de control G1, que se impone principalmente a través de la acción de la proteína supresora de tumores p53 (Smits & Gillespie, 2015) (Figura 1A).

El punto de control mejor caracterizado en el que participa CHK1 es el que provoca la detención del ciclo en G2. En condiciones normales, el inicio de la mitosis se desencadena a través de la activación del complejo CDK1-ciclina B, que fosforila distintos sustratos que participan en funciones tales como promover la condensación de

la cromatina o la formación del huso mitótico. Inicialmente este complejo se encuentra fosforilado de manera inhibitoria y, a medida que avanza el ciclo celular, este complejo inhibido se va acumulando hasta alcanzar un máximo en G2. En ese momento las fosfatasas de la familia CDC25 provocan su activación a través de la desfosforilación de CDK1, iniciándose así el proceso mitótico (Lindqvist *et al.*, 2009). En situaciones de daño en el ADN, CHK1 fosforila e inhibe a las fosfatasas de la familia CDC25 y, simultáneamente, fosforila y estimula la actividad de las quinasas Wee1, las cuáles se encargan de fosforilar los complejos CDK1-ciclina B (Chen *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2001). Esto mantiene altos los niveles de fosforilación inhibitoria en dichos complejos mientras persista el daño en el ADN, generando un arresto en la fase G2 del ciclo.

En cuanto a lo que refiere al punto de control intra-S existe una regulación similar. La entrada en la fase de síntesis precisa de distintos complejos CDK-ciclina activos que poseen una retroalimentación positiva. Estos complejos se van acumulando a lo largo de la fase G1 y comienzan a fosforilar a una proteína nuclear denominada proteína del retinoblastoma (RB1) la cual se halla enlazada de forma inhibitoria a una serie de factores de transcripción denominados E2F. Una vez RB1 es fosforilada, los E2F se liberan, promoviendo la síntesis de aquellas proteínas necesarias para comenzar la fase de replicación, entre ellas más CDK y ciclinas que se conjugan formando nuevos complejos y de ahí la retroalimentación positiva (Bertoli *et al.*, 2013). Uno de estos complejos es el CDK2-ciclina E, necesario para la formación de orígenes de replicación y que también es regulado por fosforilación inhibitoria de forma análoga a la de CDK1. En este caso, la inhibición mediada por CHK1 de las fosfatasas CDC25 como respuesta al daño en el ADN en la fase S, implica un incremento en los niveles de fosforilación inhibitoria del complejo CDK2-ciclina E. Esto, a su vez, supone una ralentización de la replicación del material genético al disminuirse el número de orígenes de replicación, constituyéndose así el punto de control intra-S (Figura 1B).

Obviamente, estos efectos sobre CDK2 también contribuyen a evitar la formación de nuevas horquillas durante la inhibición de la síntesis del ADN. Además de esto, se ha observado que tanto en condiciones normales como de estrés replicativo, CHK1 se une y fosforila de forma inhibitoria a una proteína denominada Treslin. Esta última forma parte de un complejo necesario para la activación de los orígenes de replicación, para lo cual también se requiere su fosforilación mediada por los complejos CDK-ciclina (Guo

et al., 2015). No está claro si CHK1 también inhibe la función de Treslin indirectamente al afectar a estos complejos.

En lo que respecta a la estabilización de las horquillas de replicación llevada a cabo por CHK1 en condiciones de estrés replicativo, se tiene solo una evidencia indirecta. Experimentos que involucran la inhibición de síntesis de ADN mediante fármacos como la hidroxiurea o afidicolina muestran que, en condiciones en las que CHK1 se encuentra ausente, el daño al ADN se acumula progresivamente y el número de horquillas estancadas capaces de reiniciarse tras la retirada del tratamiento farmacológico se ve reducido (Paulsen & Cimprich, 2007; Feijoo *et al.*, 2001). Se presume que CHK1 mantiene esta estabilidad mediante la interacción con nucleasas y/o con componentes del replisoma (Smits & Gillespie, 2015).

Finalmente, en lo referido al punto de control S-M, parece obvio pensar que el mantenimiento de altos niveles de fosforilación inhibitoria de CDK1 a través de la acción sobre las enzimas CDC25 constituye nuevamente la base del arresto del ciclo celular. Pero, a pesar de esto, algunos estudios muestran una falta de correlación entre los niveles de fosforilación de CDK1 y la eficacia de este punto de control. Por otro lado, se observó una estrecha correlación entre el colapso completo de la horquilla de replicación y el inicio de la mitosis prematura. Estos resultados apuntan a que CHK1 impediría la entrada en mitosis mediante el mantenimiento del estado replicativo (Zachos *et al.*, 2005). La resolución del funcionamiento de este mecanismo se encuentra aún pendiente de investigación (Figura 1C).

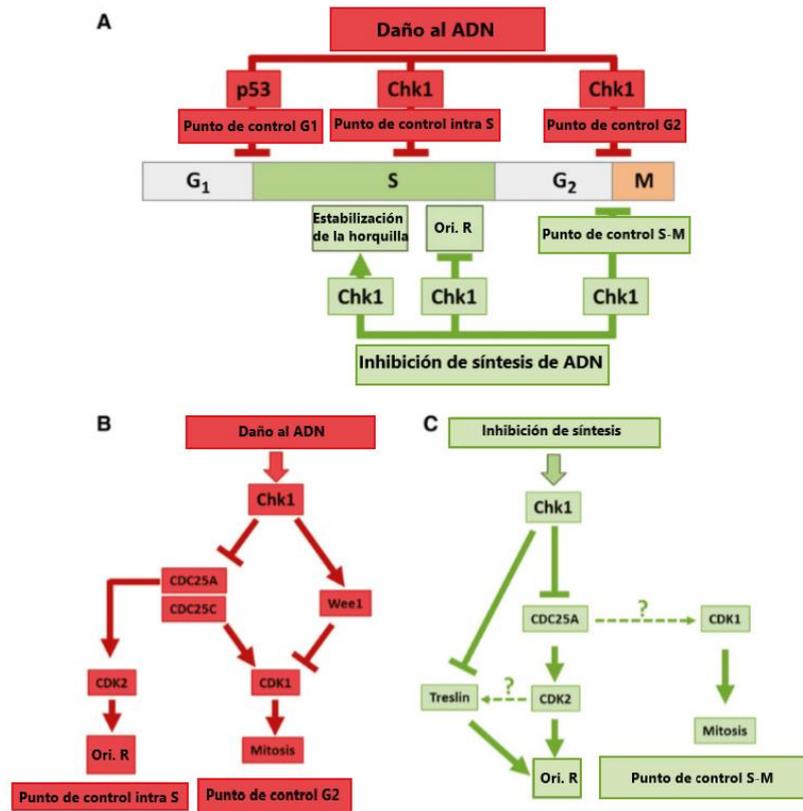


Figura 1: Esquema de los puntos de control inducidos por daño genómico y estrés replicativo. CHK1 participa en todos los mecanismos a excepción del punto de control en G1. El daño genómico detectado en la fase S provoca una disminución en el número de orígenes de replicación (Ori. R), mientras que su detección en la fase G2 induce un arresto del ciclo celular. En ambos casos CHK1 ejerce su efecto aumentando los niveles de fosforilación inhibitoria en complejos CDK-ciclina mediante la fosforilación de las fosfatasas CDC25 y de las quinasas Wee1. En los casos de estrés replicativo se genera también una disminución del número de Ori. R. así como una estabilización de las horquillas replicativas ya formadas y una obstaculización de la entrada en mitosis. Para ello, CHK1 vuelve a ejercer su actividad quinasas sobre las fosfatasas que regulan los complejos CDK. Además de esto, ejerce un efecto sobre la proteína Treslin, reforzando la disminución del número de Ori. R. funcionales. Adaptado de Smits & Gillespie (2015).

Una vez se produce la entrada en mitosis, CHK1 continúa siendo un elemento necesario para una división celular óptima debido a su asociación con la proteína Aurora B. La quinasas Aurora B es un componente del complejo pasajero de los cromosomas, conjunto proteico que desempeña papeles clave en los puntos de control del huso y de la citocinesis. El punto de control del huso previene la aparición de anafase hasta que todos los cromosomas hayan logrado la unión bipolar a los polos opuestos del huso y es

crucial para evitar la mala segregación y pérdida de cromosomas (Adams, *et al.*, 2001). El punto de control citocinético, por otro lado, retrasa la división en aquellas células que no han podido completar la replicación total del genoma (Nähse, *et al.* 2017). CHK1 actúa como regulador de ambos PCC al controlar la actividad de Aurora B vía fosforilación (Peddibhotla, *et al.* 2009; Petsalaki, *et al.* 2011).

La activación de la respuesta y los mecanismos de reparación del genoma

La activación de CHK1, ya sea como respuesta a la formación de roturas en el ADN o al impedimento de su replicación, está íntimamente ligada a la formación de fragmentos de ADN monocatenario o de “cadena simple” (ssDNA del inglés single-stranded DNA). La formación de dichos fragmentos varía en función del tipo de estrés genotóxico. En situaciones de estrés replicativo, es el desacoplamiento de las polimerasas lo que genera el ssDNA, fenómeno que ocurre casi exclusivamente en la fase S (Byun *et al.*, 2005). En el caso de las roturas de doble cadena, estos fragmentos se originan como resultado de la resección de nucleótidos en los extremos 5' de ambas cadenas, proceso necesario para llevar a cabo la reparación de este tipo de roturas mediante recombinación homóloga. Esto ocurriría predominantemente en las fases S y G2 (Jazayeri *et al.*, 2006).

Actualmente se considera que la activación de CHK1 en ambas circunstancias depende de la formación de un complejo multi-proteico que se acopla en estas zonas de ssDNA y en el que participan al menos 6 proteínas. El proceso de activación sería el siguiente: Una vez el ssDNA se origina, este se enlaza con la proteína de replicación A (RPA) lo que lleva al reclutamiento de una quinasa denominada ATR gracias a su asociación con la proteína ATRIP, quien reconoce específicamente a los complejos ssDNA-RPA (Namiki & Zou, 2006). Paralelamente, el complejo 9:1:1 se incorpora alrededor del ADN dañado en una estructura en forma de abrazadera mediante la acción del factor de replicación C y la proteína Rad17 (Edgardo *et al.*, 2004). Seguidamente, TopBP1 se recluta a través de una unión dependiente de fosforilación con el complejo 9:1:1, lo que inicia la actividad quinasa de ATR mediante la interacción con su “dominio de activación” (Delacroix *et al.*, 2007). Esto conduce a la fosforilación de Claspin dependiente de ATR, tras lo cual es capaz de reclutar al CHK1 inactivo para que este

durante el daño genómico, dando lugar a filamentos de nucleoproteína esenciales para la búsqueda y el intercambio de secuencias homólogas durante el proceso de reparación (Baumann & West, 1998). Para esta asociación entre ADN y RAD51 se requiere de la interacción previa de RAD51 con una proteína denominada BRCA2, la cual regula tanto la localización intracelular como la afinidad de unión de RAD51 al ADN en circunstancias de daño genómico (Davies *et al.*, 2001). La fosforilación de RAD51 mediada por CHK1 es requerida para promover su interacción con BRCA2 (Bahassi *et al.*, 2008).

El daño en el ADN también está ligado a cambios en la expresión de ciertos genes, algunos de ellos por vía epigenética. A este respecto se sabe que la fosforilación de la histona 3 (H3) mediada por CHK1 es habitual en los promotores de los genes de CDK1 y ciclina en células no dañadas. Mientras que la disociación de CHK1 de la cromatina implica una reducción en los niveles de fosforilación de esta histona (Shimada M. *et al.*, 2008). La ausencia de este tipo de fosforilación está correlacionada con una disminución de los niveles de acetilación de H3, lo que a su vez implica un descenso de la transcripción génica que explicaría la represión transcripcional observada de los genes CDK1 y ciclina B después del daño en el ADN (Shimada M. *et al.*, 2008).

Estructura y auto inhibición

La CHK1 humana es una proteína nuclear de 476 aminoácidos. Posee un dominio de quinasa N-terminal, una región enlazadora flexible en la que se ubica un dominio regulador que contiene cuatro residuos de serina y de glutamina, llamado dominio SQ y una región C-terminal donde se haya un dominio auto inhibitorio de tipo KA1, que contiene en sus extremos dos motivos de secuencia conservados denominados CM1, más próximo al extremo N-terminal y CM2, más próximo al extremo C-terminal (Emptage, *et al.* 2017).

El dominio catalítico posee la estructura bilobulada canónica de las quinasas, estando tanto el centro activo como el sitio de unión de ATP ubicado en la hendidura entre los dos lóbulos, que se mantienen unidos gracias a una extensa red de puentes de hidrógeno. El lóbulo correspondiente a la parte N-terminal está constituido fundamentalmente de una estructura en lámina beta y dos estructuras hélice alfa. Es este

lóbulo el que posee los residuos necesarios para la adhesión del ATP, posicionando adecuadamente el fosfato γ para que sea transferido al sustrato. En el lóbulo más cercano al extremo C-terminal, por otro lado, predominan las hélices alfa, aunque también contiene una pequeña estructura de tipo lámina beta. El péptido sustrato se acopla al extremo de la hendidura formado por este lóbulo, de esta forma el fosfato γ del ATP puede ser transferido directamente al grupo OH del aminoácido fosforilable. Este dominio se encuentra en una conformación perpetuamente activa, tanto en el complejo de unión CHK1/ATP como en la apoenzima, lo que remarca el papel del dominio autoinhibitorio (Chen *et al.*, 2000).

Este dominio de autoinhibición, denominado dominio asociado a quinasa uno (KA1) consta de dos hélices alfa y 5 láminas beta y, como su nombre indica, establece interacciones proteína/proteína con el dominio quinasa, impidiendo la adhesión al sustrato en condiciones normales. La fosforilación de CHK1 mediada por ATR ocurre en los residuos de serina 317 y 345 ubicados en el dominio SQ. Esto genera un desacoplamiento de KA1, lo que libera el dominio catalítico y permite tanto la fosforilación de sustratos corriente abajo como la autofosforilación de CHK1. Los mecanismos moleculares subyacentes a este proceso no están claros, pero ciertos estudios aluden a la naturaleza básica de los motivos conservados CM1 y CM2 y proponen un modelo basado en la interacción entre las cargas eléctricas netas de los residuos del dominio quinasa y el KA1, que se vería afectada por la adición de grupos fosfato en la región enlazadora; ya sea de forma directa, por los efectos de repulsión y atracción que supondrían los grupos fosfato cargados negativamente. O de forma indirecta y/o asistida, mediante la unión de otras moléculas en los sitios de fosforilación y/o en el dominio KA1 (Emptage *et al.*, 2017) (Figura 3).

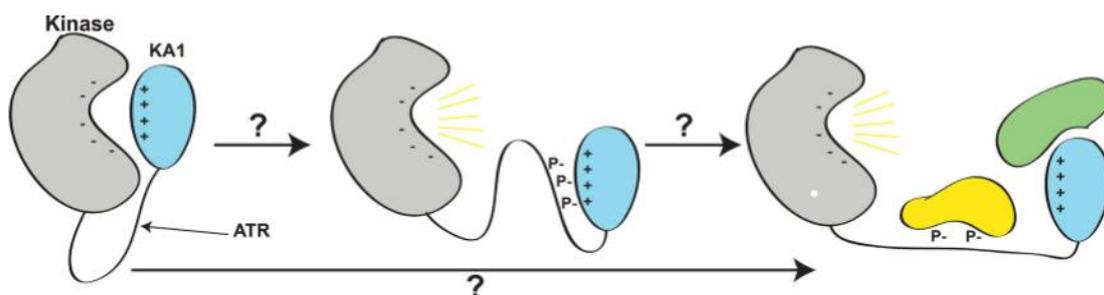


Figura 3: Modelo propuesto para el papel de la fosforilación del enlazador en la activación de Chk1. Aún no se conoce cómo la fosforilación de la región enlazadora entre los dominios de quinasa (gris) y

KA1 (azul) de Chk1 por ATR resulta en el cese de la autoinhibición y activación completa de Chk1 (líneas amarillas) quizás incluyendo la asistencia de otro tipo de proteínas (flecha inferior, proteína amarilla y proteína verde). Debido a la relación entre la capacidad autoinhibitoria de KA1 y la existencia de motivos conservados con un alto grado de residuos básicos (CM1 y CM2) se ha propuesto que la fosforilación de la región de enlace por ATR y la posterior autofosforilación pueden interrumpir la interacción carga-carga entre KA1 y el dominio de quinasa mediante la unión de fosfatos cargados negativamente. Esta conformación podría activar Chk1 por sí sola, o actuar como un intermediario entre el estado autoinhibido y la activación sostenida a través de la unión de otros socios en los sitios de fosforilación de Chk1 o el propio dominio KA1. Tomado de Emptage *et al* (2017).

Regulación ligada a ubiquitina

La obvia incompatibilidad entre la activación del punto de control y la división celular lleva inevitablemente a la deducción de que aquellas células que efectúan una reparación exitosa tras daño al ADN deben de ser capaces de abandonar el arresto y continuar con las distintas fases del ciclo. Para lograr esto es necesaria la desactivación regulada de CHK1, la cual se logra a través de la degradación por vía del proteosoma. Este consiste en un gran complejo proteasa que digiere las proteínas sometidas a determinada modificación mediante la catálisis de una reacción que ataca a los grupos carbonilo de los enlaces peptídicos. Está integrado por muchas subunidades, es activado por ATP y consta de dos componentes: una parte catalítica 20S y una parte reguladora 19S, teniendo la estructura total un coeficiente de sedimentación de 26, por lo que habitualmente es llamado proteosoma 26S. Para que la degradación mediada por el proteosoma se efectúe de forma coordinada es necesario someter previamente a las proteínas a un proceso denominado ubiquitinación (Nelson & Cox, 2009).

La ubiquitinación es una modificación postraduccional que consiste en la unión covalente de una molécula de ubiquitina (Ub), un pequeño polipéptido de 76 aminoácidos, a una proteína sustrato. El mecanismo de ubiquitinación se compone de tres reacciones enzimáticas selectivas, catalizadas por la enzima activadora de la ubiquitina (E1), la enzima conjugadora de la ubiquitina (E2) y la llamada ubiquitina ligasa (E3) (Strieter & Korasick, 2012). En primer lugar, la molécula de ubiquitina es activada por E1, en una vía dependiente de ATP y transferida a E2. Tras lo cual E3 se une específicamente con el sustrato para mediar la transferencia de la ubiquitina desde

E2 a un residuo de lisina de la proteína diana o a la propia E3 que posteriormente puede transferirla a la proteína diana (Figura 4).

El reconocimiento de la proteína sustrato por parte de E3 es dependiente de la existencia de determinadas secuencias de aminoácidos denominadas degrones. Estas secuencias constituyen motivos conservados que, al someterse a ciertas modificaciones que involucran la adición de grupos reactivos, principalmente fosforilaciones, constituyen dianas para la interacción con las ubiquitina ligasas.

Finalmente, la unión covalente al sustrato se produce por medio del enlace isopeptídico entre la glicina C-terminal de la ubiquitina y los grupos amino de los residuos de lisina de la proteína diana. La repetición de este proceso puede dar lugar a la unión covalente entre ubiquitinas, de manera que una proteína sustrato puede presentar cadenas de ubiquitina (poliubiquitinación). Si esta poliubiquitinación consiste en la adición de cuatro o más moléculas de ubiquitina unidas a la lisina 48, la proteína queda “marcada” para su degradación por vía del proteosoma (Nelson & Cox, 2009).

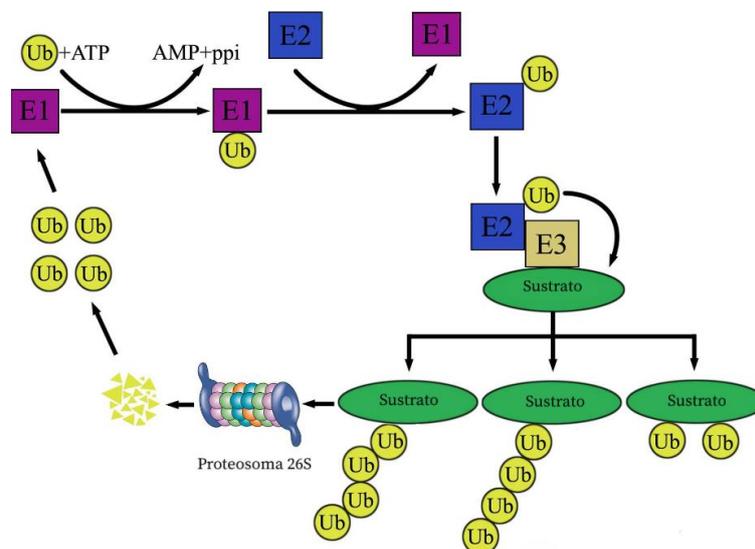


Figura 4: Esquema de la ruta ubiquitina-proteosoma. La ubiquitinación del sustrato se realiza a través de un conjunto de reacciones secuenciales realizadas por las enzimas E1 (enzima activadora de la ubiquitina), E2 (enzima conjugadora de la ubiquitina) y E3 (ubiquitina ligasa). Muchos de estos sustratos poliubiquitinados son degradados por el proteosoma 26S generando péptidos de pequeño tamaño. Las ubiquitinas que estaban unidas al sustrato son recicladas. Adaptado de Gong *et al* (2015).

Este proceso puede ser revertido mediante la escisión de las moléculas de ubiquitina de la proteína sustrato, catalizada por la enzima deubiquitina (DUB), también conocida como hidrolasa de ubiquitina. El mecanismo de deubiquitinación se lleva a cabo mediante la hidrólisis del enlace peptídico entre el residuo de glicina de la ubiquitina y el residuo de lisina de la proteína ubiquitinada (Reyes *et al.*, 2009). La actividad de las DUBs es también selectiva para sustratos específicos y/o formas específicas de conformaciones de ubiquitinas.

En el caso de CHK1 nos encontramos ante un marco de degradación específica de las formas activas fosforiladas en la serina 345. Es esta fosforilación mediada por ATR lo que marca la proteína CHK1 como sustrato de enzimas ubiquitina ligasas, lo que provoca su degradación y el consecuente descenso en los niveles de CHK1 activo tras el estrés de replicación. Se ha demostrado que la ubiquitinación de CHK1 está mediada por dos complejos distintos: CRL1-SKP1-Fbx6 y CRL4-DDB1-CDT2. Se cree que estos complejos promueven la degradación de CHK1 en diferentes compartimentos celulares: CRL1-SKP1-Fbx6 en el citoplasma y CRL4-DDB1-CDT2 en el nucleoplasma (Smits & Gillespie, 2015). Además, un hecho de especial importancia en este trabajo es que se ha demostrado que el complejo CRL1-SKP1-Fbx6 fue capaz de reconocer un degrón ubicado dentro el dominio KA1 de Chk1 (Zhang *et al.*, 2009).

Cabe mencionar también que las deubiquitinasas juegan un papel importante en la determinación de la estabilidad CHK1, ya que algunas de estas como USP7 antagonizan la ubiquitinación de CHK1. Por lo tanto, parece acertado suponer que la regulación de estas actividades de deubiquitinasas pueda contribuir a la regulación del punto de control a través de CHK1.

Objetivos

La actividad de CHK1 está regulada a través de una interacción intramolecular entre el dominio quinasa y el dominio autoinhibitorio C-terminal KA1. Estudios anteriores han demostrado que aquellas mutaciones diseñadas para interrumpir la estructura del dominio KA1 provocan la activación de CHK1, además de desencadenar un proceso de autofosforilación y degradación rápida a través de la vía del proteosoma. A su vez,

existen mutaciones diseñadas para afectar al dominio KA1 que son capaces de dar lugar a formas de CHK1 activo sin llegar a desorganizar la estructura de KA1. Nuestra hipótesis es que existe un “fosfo-degrón” escondido dentro el dominio KA1, que quedaría expuesto como consecuencia de dichas mutaciones, las cuáles son equivalentes al proceso de activación regulado de CHK1. Por ello, el objetivo principal de este trabajo fue determinar si las mutaciones capaces de activar CHK1 sin desestabilizar estructuralmente a KA1 también resultan en la auto-fosforilación y degradación rápida de CHK1. En caso afirmativo, se sugeriría que el hipotético degrón siempre está expuesto y que es fosforilado durante y como consecuencia del proceso de activación de CHK1. Mientras que un caso negativo, indicaría que la fosforilación y exposición de la secuencia degrón pueden ser separados de la activación de CHK1 *per se*.

Material y Métodos

Cultivos celulares

Se utilizó la línea celular tumoral DT40 derivada de linfocitos bursales de pollo. Las células crecieron en medio líquido DMEM, suplementado con suero de pollo (1%), suero fetal bovino (10%) y L-glutamina (2,5 mM) para el enriquecimiento de nutrientes. Además, el medio se complementó con penicilina (100 UI/ mL) y estreptomina (100µg/ mL) para prevenir contaminaciones bacterianas. Para su correcto desarrollo, las células crecieron en estufa, con una atmósfera saturada de agua, al 5 % de CO₂ y una temperatura de 37 °C. La siembra se realizó en placas de Petri de 6 o 10 cm de diámetro dependiendo de las necesidades del experimento y para utilizar las células en los experimentos, los cultivos se lavaron con PBS (Tampón fosfato salino, Tabla 1).

PBS pH 7,4
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na ₂ HPO ₄
1,47 mM KH ₂ PO ₄

Tabla 1: Composición del tampón fosfato salino (PBS)

Creación de las líneas DT40 CHK1-WT, CHK1-L393P, CHK1-B3 y CHK1-B5

El procedimiento de obtención de las líneas de células DT40 capaces de expresar WT CHK1 y los mutantes CHK1-L393P, CHK1-B3 (que incluye las mutaciones: V412A, T413A y S415A) y CHK-B5 (que incluye las mutaciones: V428A, L430A y M433A) fue descrito en Gong et al., 2015. Una línea padre, 3T, que carece de la expresión del CHK1 endógeno como consecuencia del “knock-out” de ambas copias del gen (Zachos et al., 2003), fue modificada para expresar el TetR represor e introducir un casete de expresión, sensible a doxiciiclina, e incorporando los plásmidos que llevan los mutantes de CHK1. Cada una de estas líneas solo expresa WT CHK1, o el correspondiente mutante, cuando los cultivos son tratados con doxiciiclina (Figura 5).

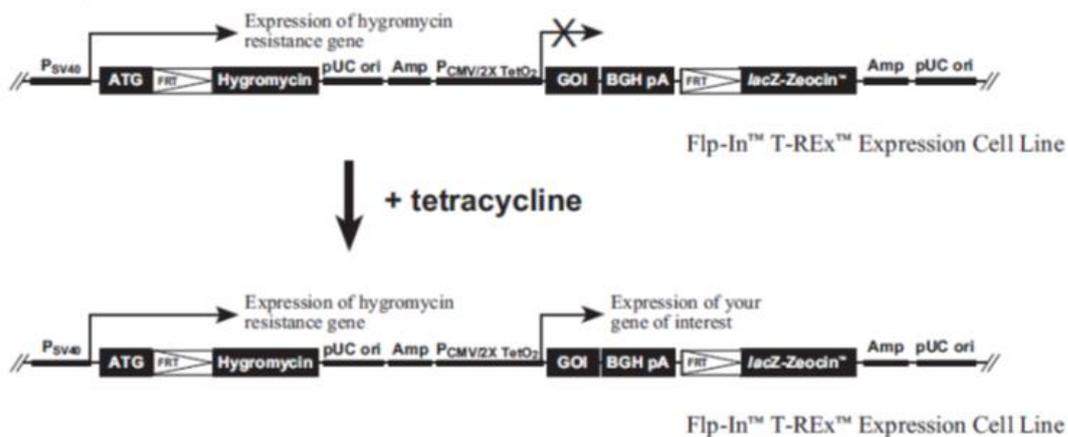


Figura 5: Esquema de la activación transcripcional controlada por doxiciiclina. Modelo Flp-In T-REx. El sistema requiere la utilización de diversos plásmidos y transfecciones concatenadas. En primer lugar, se incorporan 2 plásmidos. El primero de ellos contiene una secuencia que constituye un lugar de recombinación, así como genes de resistencia a antibióticos que permiten seleccionar a las células que han incorporado correctamente el plásmido. El segundo está diseñado para asegurar la expresión del represor Tet (TetR) en condiciones normales y también contiene genes de resistencia antibióticos con el mismo fin. Una vez ambos se han transfectado de manera óptima, se añaden conjuntamente otros dos plásmidos: El vector de expresión que contiene nuestro gen de interés (en este caso CHK1 WT o sus variantes) que además incluye otra región de recombinación y cuya expresión es controlada por un promotor CMV con secuencias específicas del operón Tet (TetO). Y un plásmido que codifica una enzima de recombinación, la cual se encarga de fusionar el vector expresión de nuestro gen de interés con el plásmido inicial, que también contenía un lugar de recombinación. El resultado final es lo que se muestra en la figura, un casete de expresión que se mantiene inactivo en condiciones normales, debido

a la acción del TetR sobre el promotor. Y que es capaz de activarse una vez se añade algún tipo de tetraciclina (en este caso doxiciclina), debido a la interacción de estas moléculas con el represor, lo que impide que este se una al ADN. Adaptado del manual del sistema Flp-In TREX.

Además, se ha de recalcar el hecho de que las mutaciones B3 y B5 fueron diseñados con la expectativa de desacoplar los dominios catalítico y auto inhibitorio sin provocar una desestabilización de la estructura del dominio KA1, a diferencia de L393P, que fue diseñado con la intención de generar su desnaturalización. Sin embargo, los efectos de ambos tipos de mutaciones sobre la actividad de CHK1 probablemente se basan en inhibir las interacciones intramoleculares entre KA1 y el dominio quinasa.

Tratamientos

Doxiciclina

Para controlar la expresión de CHK1 y de sus formas mutantes se incubaron las células con doxiciclina (2 μ M) durante 16 h aproximadamente. Este compuesto es un antibiótico semisintético del grupo de las tetraciclinas. Su efecto sobre las células de la línea empleada consiste en la activación del vector de expresión en el que se incluyeron las secuencias mutadas.

Cicloheximida

Para estudiar como varían los niveles de CHK1, las células se trataron con cicloheximida (20 μ M) durante tiempos distintos dependiendo del experimento. La cicloheximida (CHX) es un metabolito secundario, producido por *Streptomyces griseus*, que actúa inhibiendo la síntesis proteica en eucariotas, pues interfiere con la actividad peptidil transferasa del ribosoma, bloqueando la elongación traduccional.

Inhibidor de proteosoma

Las células se trataron con un inhibidor del proteosoma, MG132 (2 μ M) durante 16 h aproximadamente, para estudiar como varían los niveles de CHK1 y poner en evidencia así su degradación por el proteosoma. MG132 es un péptido aldehído capaz de inhibir la actividad catalítica del proteosoma al afectar a la actividad de tipo quimotripsina.

Extractos celulares

Los extractos celulares se obtuvieron sometiendo los cultivos celulares a centrifugado (1000 rpm.) durante 5 min descartando el sobrenadante, resuspendiendo las células del pellet con 1 mL de PBS, repitiendo una centrifugación de 5 min (5000 rpm), descartando nuevamente el sobrenadante, y añadiendo 150 µl de tampón de lisis desnaturante 1X (Urea-SDS, Tabla 2). Tras esto, se pasaron los extractos a tubos Eppendorf de 1,5 mL y se sometieron a sonicado (20 segundos con sonicador UP50H, de Hielscher-Ultrasonics a una frecuencia de 60 Hz).

Tampón de lisis desnaturante 1X (Urea-SDS)
50 mM Tris-HCl pH 8
1% SDS
6 M Urea
250 mM NaCl

Tabla 2: Composición del tampón de lisis desnaturante 1X (Urea-SDS)

Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteínas en cada muestra se determinó usando el ensayo del ácido bicinonónico (BCA). Este método combina la reacción de proteínas con Cu^{+2} en un medio alcalino, produciendo Cu^+ , con un reactivo para la detección de esos iones Cu^+ , el BCA. El BCA quela los iones formando complejos de color púrpura que pueden ser detectados con un espectrofotómetro. Así, la absorbancia de la muestra es proporcional a la cantidad de Cu^+ presente, que se correlaciona con la cantidad de proteína presente en la muestra. En el protocolo se utilizan extractos de concentración desconocida y se realiza una recta de calibrado con albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración conocida. Cada muestra se incuba en un pocillo, de una placa de 96 pocillos, con una mezcla de BCA y sulfato de cobre en una proporción 50:1, a 37 °C durante 30 minutos. Seguidamente se miden las absorbancias a 540 nm, se construye la recta con las medias de absorbancia medidas para la albúmina y las concentraciones previamente conocidas y se obtienen las concentraciones de proteína mediante interpolación.

Western Blot

Western Blot (WB) es una técnica analítica para el estudio de proteínas. Este método permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica compleja. La

especificidad del WB se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce la proteína a estudiar.

El WB consiste en separar las proteínas en una electroforesis desnaturalizante, transferir las proteínas a una membrana y detectar específicamente una de las proteínas de la membrana mediante un anticuerpo específico que se une a ella y un método que permita detectar a ese anticuerpo. En nuestro caso hemos usado otro anticuerpo conjugado con HRP (Peroxidasa de rábano) que es detectado por quimioluminiscencia. En las tablas 8 y 9 se muestra un listado de los anticuerpos usados, con las diluciones empleadas y casas comerciales.

Electroforesis

Los extractos fueron incubados con el tampón de carga (Tabla 3) y con Ditiotreitól (DTT, 5 mM) a 95 °C durante 5 minutos antes de cargar el gel. Una vez hecho esto se cargaron cantidades idénticas de muestra en cada pocillo (usando siempre la concentración de proteína más baja detectada, que solía estar en torno a 0,2 mg/mL).

<p>Tampón de carga desnaturalizante o tampón Laemmli 4X 500 mM Tris-HCL pH 6,8 (ie 4 x 125 mM Tris-HCL pH 6,8) 20% Glicerol 2% SDS 20 mM DTT 25 µg/mL Azul de bromofenol</p>
--

Tabla 3: Composición del tampón de carga

Las electroforesis se realizaron en geles discontinuos de poliacrilamida al 4% para los geles compactadores. Para los geles separadores se usó 8% para los ensayos realizados con β -Actina como proteína de control de carga y al 10% para los casos en los que se usó PCNA (Tabla 4).

Gel compactador	Gel separador
4% Acrilamida:bisacrilamida (29:1) 125 mM Tris-HCl pH 6,8 0,1% SDS	8% ó 10% Acrilamida:bisacrilamida (29:1) 375 mM Tris-HCl pH 8,8 0,1% SDS

Tabla 4: Composición de los geles compactador y separador

La electroforesis se realizó con el sistema de minigeles de Bio-Rad (Mini-PROTEAN® 3 o Tetra) utilizando el tampón de electroforesis (Tabla 5) y aplicando un voltaje de 120V-160V.

<p style="text-align: center;">Tampón de electroforesis</p> <p style="text-align: center;">25 mM Tris</p> <p style="text-align: center;">192 mM Glicina</p> <p style="text-align: center;">1% SDS</p>
--

Tabla 5: Composición del tampón de transferencia

Transferencia

La transferencia de proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (modelo Protean con poro de 0.45 µm, de GE Healthcare) se realizó usando el sistema de transferencia de minigeles de Bio-Rad (Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell) con tampón de transferencia al que se le añadió etanol al 20% (Tabla 6) a una intensidad de corriente constante de 300 mA y 100 V durante 1 hora.

<p style="text-align: center;">Tampón de transferencia</p> <p style="text-align: center;">25 mM Tris</p> <p style="text-align: center;">192 mM Glicina</p> <p style="text-align: center;">20% SDS</p> <p style="text-align: center;">20% etanol</p>
--

Tabla 6: Composición del tampón de transferencia + 20% Etanol

Inmunodetección

Una vez llevada a cabo la transferencia, la membrana se incubaba en 10 mL de solución bloqueante de albúmina de suero bovino al 2,5% en tampón fosfato salino (TBS) suplementado con 0,1 % Tween 20 (Tabla 7). El tiempo de incubación fue de 1 hora a temperatura ambiente.

<p style="text-align: center;">TBS-T</p> <p style="text-align: center;">25 mM Tris-HCl pH 7,4</p> <p style="text-align: center;">137 mM NaCl</p> <p style="text-align: center;">0,1% Tween 20</p>
--

Tabla 7: Composición del tampón fosfato salino + 0,1% Tween 20 (TBS-T)

Luego se incubó la membrana con anticuerpos primarios específicos para la CHK1 total o para la CHK1 autofosforilada en treonina 378 y en 382 según el ensayo, añadiendo 2 μL de estos anticuerpos a la solución bloqueante. La incubación duró unas 16 horas aproximadamente y se realizó a 4 °C de temperatura y en condiciones de agitación. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-T y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-especie correspondiente acoplado a HRP en TBS-T por 1 hora a temperatura ambiente, añadiendo nuevamente 2 μL de este anticuerpo al TBS-T. Después, se repitieron los 3 lavados de 10 min con TBS-T, se procedió a la adición de los reactivos de la solución de quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico, de Thermo Scientific) y se colocó la membrana para su detección en el equipo de quimioluminiscencia Image Quant LAS4000 mini (GE Healthcare). Los anticuerpos utilizados se describen a continuación (Tablas 8 y 9).

Anticuerpos Primarios			
Antígeno	Especie	Fabricante	Dilución
CHK1	Ratón	SantaCruz Biotech	1:4000
CHK1 pT378/pT382	Conejo	EuroGenTec	1:2000
β -Actina	Ratón	GenScript	1:5000
PCNA	Ratón	Santa Cruz Biotech	1:4000

Tabla 8: Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de CHK1, β -Actina y PCNA

Anticuerpos Secundarios			
Antígeno	Especie	Fabricante	Dilución
IgG Ratón	Conejo	Abcam	1:5000
IgG Conejo	Cabra	Abcam	1:5000

Tabla 9: Anticuerpos secundarios utilizados

Normalización de proteínas

Tras la realización de los Western Blots, las proteínas fueron analizadas cuantitativamente con el programa de procesamiento de imágenes digitales ImageQuant TL (GE Healthcare Life Sciences), normalizando los datos de expresión de CHK1 con los datos de la proteína utilizada como control de carga, PCNA.

Resultados y Discusión

Las diferentes mutaciones sobre el dominio KA1 afectan de manera distinta a la estabilidad de CHK1

Para evaluar si existían diferencias notables entre la preservación en el tiempo de los distintos mutantes realizamos ensayos de estabilidad mediante Western Blot, utilizando el inhibidor de síntesis proteica cicloheximida tras la inducción de la expresión de los genes de CHK1 mediante doxiciclina. Con esto se buscaba comparar cuantitativamente los niveles de las distintas formas de CHK1 a lo largo de un cierto período de tiempo, lo que nos llevaría a encontrar diferencias entre la estabilidad de algunos de los mutantes.

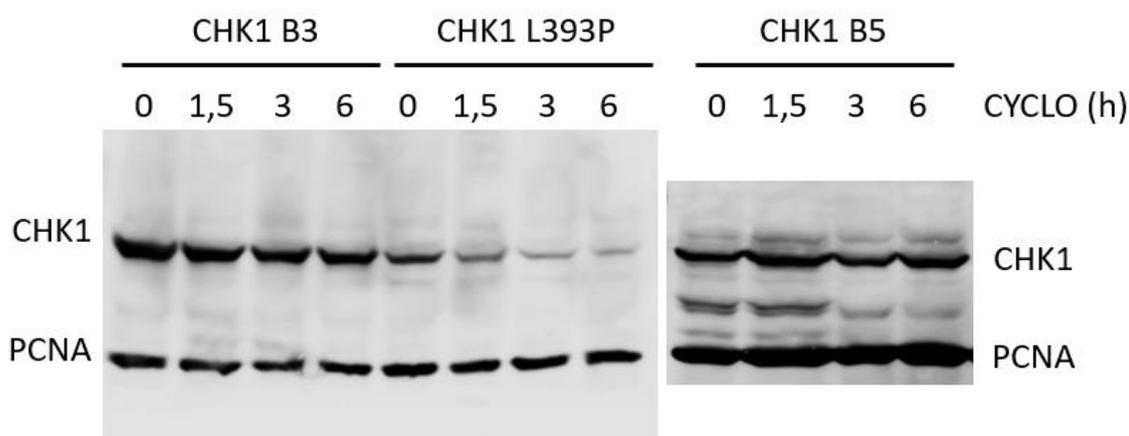


Figura 6: Estudio de estabilidad de los mutantes de CHK1. Todas las células fueron incubadas durante 16 horas con doxiciclina, tras lo cual se prepararon los primeros extractos, se añadió la cicloheximida y se fueron recogiendo las células a los tiempos indicados. Los extractos celulares obtenidos en las horas iniciales se preservaron en frío hasta el momento en el cual se obtuvieron los correspondientes a 6 h. Posteriormente se realizaron los ensayos Western usando anticuerpos específicos para la CHK1 total y anticuerpos específicos para PCNA, usada como proteína de carga.

Los resultados obtenidos muestran una diferencia notable entre los dos tipos de mutación. La mutación L393P da lugar a formas altamente inestables de la proteína, mientras que los mutantes B3 y B5 poseen una estabilidad casi idéntica y muy similar a la vista en estudios anteriores para el *wild type* (Gong *et al.*, 2018) (Figuras 6 y 7).

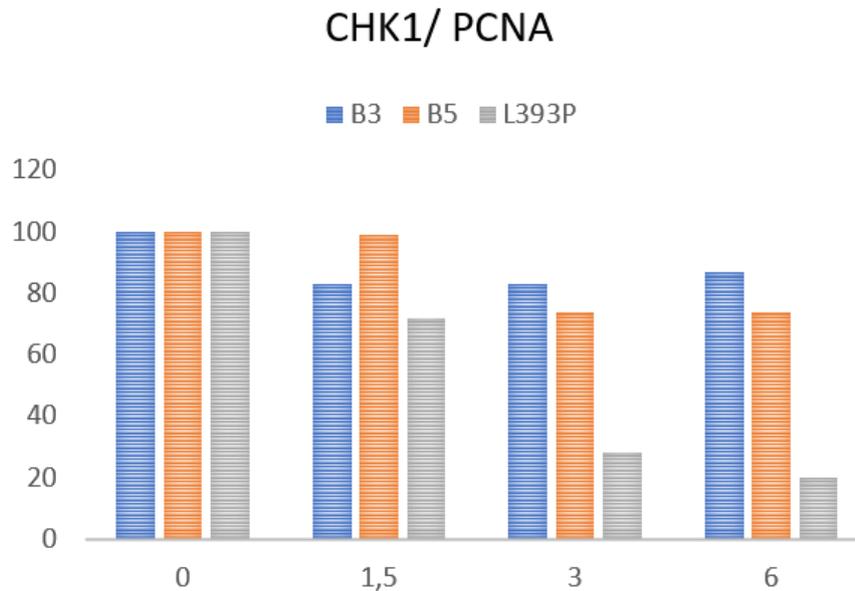


Figura 7: Cuantificación de los niveles de proteína del estudio de estabilidad. Los datos fueron obtenidos con el programa de procesamiento de imágenes digitales ImageQuant TL, normalizando los datos de expresión de CHK1 con los datos de PCNA. En el eje x se muestra la cantidad de tiempo (en horas) que se dejaron incubar las células con cicloheximida. En el eje Y se muestra el porcentaje de cada variante de CHK1 en relación a la cantidad de PCNA.

Esta disparidad en la estabilidad en el tiempo entre la forma L393P y ambas B3 y B5, ha de deberse necesariamente a un incremento de la degradación vía ubiquitina proteosoma en el caso de la mutación L393P, por lo que asumimos que esta debe tener una mayor afinidad por los complejos de ubiquitina ligasa (muy probablemente por los complejos SCF). Este hecho se correlaciona con una diferencia fundamental entre estos 2 grupos de mutaciones: Mientras que la mutación L393P fue diseñada para desestabilizar estructuralmente al dominio KA1, las mutaciones usadas en B3 y B5 fueron diseñadas con la intención de debilitar la interacción entre este y el dominio catalítico, sin llegar a comprometer su estructura.

Las mutaciones no desestabilizadoras sobre KA1 pueden dar lugar a formas activas de CHK1

Buscando comprobar el efecto de las mutaciones empleadas sobre la actividad de CHK1, así como su posible relación con la estabilidad de la proteína, sometimos a las células que portaban los plásmidos de expresión controlada a tratamiento con doxiciclina y el inhibidor del proteosoma MG132 y realizamos los Western Blots.

Estos ensayos confirmaron que todos los mutantes empleados dan lugar a formas constitutivamente activas de CHK1, puesto que todos ellos demostraron estar ligados a la autofosforilación de la proteína en las treoninas 378 y 382, fenómeno inexistente en el caso del genotipo salvaje y que se ha vinculado a la actividad de CHK1 (Gong *et al.*, 2018). Además, esta autofosforilación también puede apreciarse en los Western que emplean anticuerpos para la totalidad de las formas de CHK1, ya que se aprecia un patrón de “doble banda” en las células tratadas simultáneamente con doxiciclina y MG132. Este patrón se debería a que las formas auto fosforiladas de CHK1 se colocan formando una banda posicionada sobre las no fosforiladas debido al aumento del peso molecular que viene con la adición de los grupos fosfato (Figura 8).

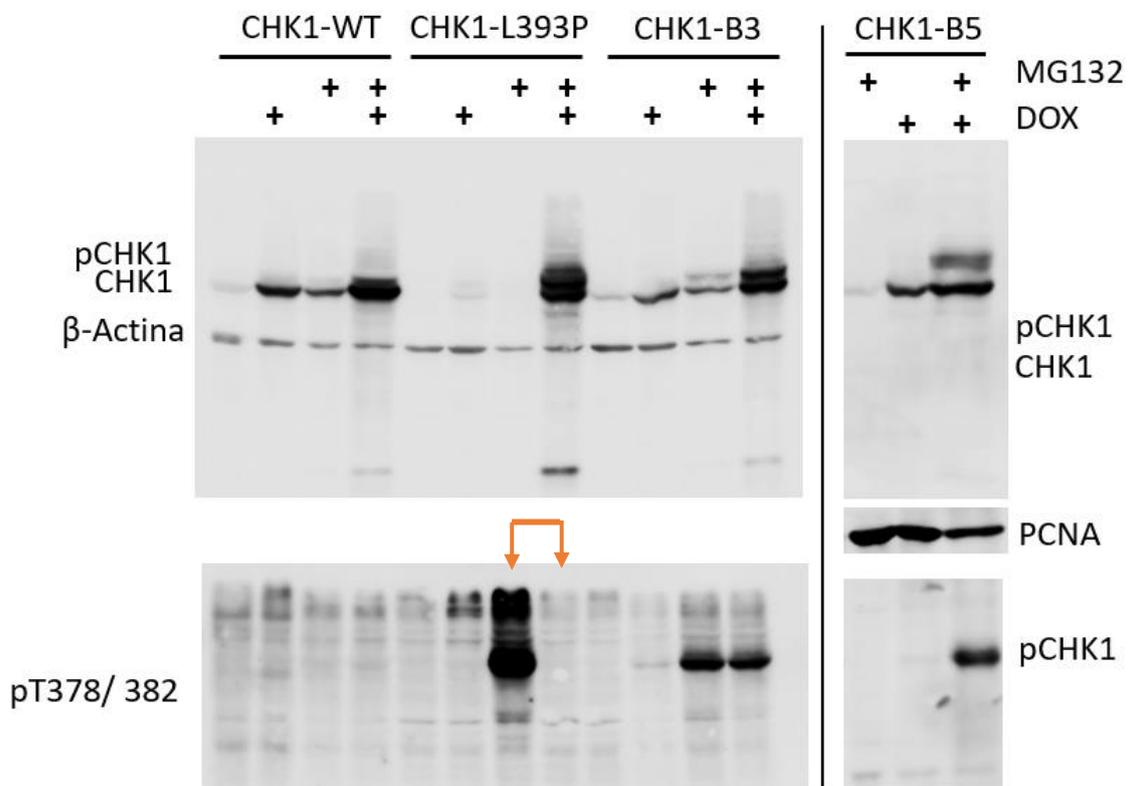


Figura 8: Identificación de la actividad de las variantes genotípicas de CHK1 y de los efectos de la inhibición del proteosoma. Todas las células fueron incubadas durante 16 horas con doxiciclina (DOX +) con el inhibidor MG132 (MG132 +) o con ambos fármacos de manera simultánea. Tras esto, se obtuvieron los extractos celulares y se realizaron los ensayos Western usando en unos casos anticuerpos que reconocían la proteína CHK1 en cualquiera de sus formas y en otros anticuerpos específicos para las treoninas en posición 378 y 382 fosforiladas. Las proteínas de carga utilizadas fueron β -Actina y PCNA. El ensayo para el mutante B5 se hizo en un momento posterior pero el procedimiento fue idéntico. Con las flechas rojas se indican los dos patrones de bandas que deben ser invertidos debido a un error en la carga de los pocillos durante el western.

Es evidente que el inhibidor del proteosoma MG132 es capaz de ejercer una serie de efectos sobre los niveles de proteína detectados para los mutantes. En primer lugar, y como ya se mencionó, el MG132 es necesario para la aparición del patrón de “doble banda” y, simultáneamente, se observa que los niveles de proteína de los mutantes L393P detectados se encuentran casi exclusivamente en los casos en los que el tratamiento de doxiciclina y MG132 fue sincrónico (Figura 8). Estos datos son coherentes con los del experimento anterior y, en conjunto, señalan tres hechos de especial relevancia para nuestro estudio: Primero, que la actividad del proteosoma ha de jugar algún papel en la conservación en el tiempo de las formas activas de CHK. Segundo, que esta actividad no condiciona los niveles de la proteína salvaje, y tercero, que la actividad del proteosoma afecta de manera distinta en función del tipo de mutación empleada, siendo L393P la forma más afectada.

Teniendo en cuenta que la activación de CHK1 está estrechamente vinculada con la regulación de su degradación por vía del proteosoma, creemos que esta disparidad entre la estabilidad de L393P y el resto de formas mutadas se debe a la presencia de una secuencia de degradación previamente reconocida en el dominio KA1, que quedaría expuesta como resultado de la desnaturalización del dominio, pero que se mantendría oculta en el caso de aquellas mutaciones constitutivamente activas que liberan el dominio catalítico sin afectar de manera significativa a la estructura de KA1. Es posible que la autofosforilación en las treoninas 378 y 382 afecte a la función o potencia de este degradable, dado que las formas autofosforiladas de la proteína sólo se han visto cuando inhibimos el proteosoma con MG132 y han aparecido en todos los mutantes. Además, es habitual que la adición de grupos fosfato constituya una modificación necesaria para que una determinada secuencia de aminoácidos pase a actuar como degradable.

Asimismo, sugerimos que la exposición de este degradable sería necesaria para la degradación del CHK1 activo en condiciones normales, estando la activación de la proteína vinculada de alguna manera a la desnaturalización del dominio KA1, probablemente mediante la adición de grupos fosfato, ya sea durante el propio proceso de activación mediado por ATR o en algún punto posterior al inicio de la actividad de CHK1 (Figura 9).

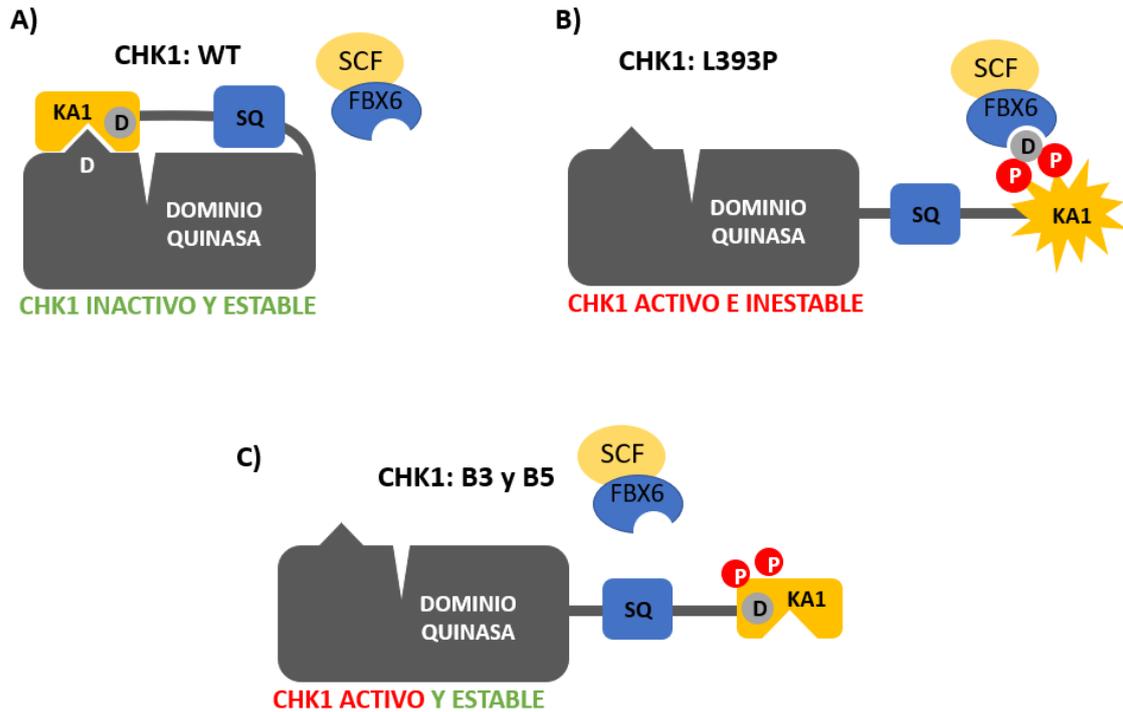


Figura 9: Modelo hipotético de regulación de la degradación de las distintas formas de CHK1 por la vía ubiquitina proteosoma. La estabilidad de cada una de las formas de CHK estaría condicionada a la exposición o no de una determinada secuencia degrón que sería liberada como consecuencia de un cambio estructural en el dominio KA1 y posiblemente fosforilada por la propia CHK1. De esta forma tenemos: A. La forma salvaje del CHK1 inactivo, cuya secuencia degrón se encuentra encerrada en el dominio KA1 debido a la estructura del mismo, lo que impediría su reconocimiento por parte del sistema de ubiquitinización SCF permitiendo que la proteína se conserve en el tiempo de manera estable. B. CHK1 con la mutación L393P, la cual provoca la desnaturalización de KA1 con el consecuente desacoplamiento de este al dominio catalítico. Esto provoca tanto su activación como la exposición de la secuencia degrón que es activada una vez se fosforila, tras lo cual el complejo de ubiquitina ligasa es capaz de reconocer y marcar a la proteína para su degradación, dando pie a una forma activa e inestable. C) CHK1 con las mutaciones B3 o B5. En este caso las mutaciones generan el desacoplamiento entre los dominios catalítico y KA1, sin llegar a variar la estructura de este último. Con esto la secuencia degrón podría llegar a modificarse por autofosforilación pero no quedaría expuesta de forma que fuese reconocible por los sistemas de ubiquitinización debido a la estructura del dominio KA1. Esto se traduce en una forma constitutivamente activa y estable en el tiempo.

A pesar de esto, los experimentos realizados hasta el momento no son suficientes como para tomar este modelo como algo constatado empíricamente. La ubicación y características de la secuencia degrón sugeridas son, con los resultados obtenidos, aún algo incierto y la utilización de PCNA como proteína de carga (sustituida a la escasez de anticuerpos para β -Actina u otros antígenos) es problemática debido a las

interacciones que podrían efectuarse entre esta y CHK1. Las labores pendientes de este proyecto iban a estar especialmente destinadas a resolver estos problemas, estudiando la naturaleza de las posibles interacciones entre CHK1 y PCNA y preparando nuevos plásmidos que afectasen a determinadas secuencias de aminoácidos dentro de CHK1 consideradas como degrones potenciales. Pero debido a las circunstancias sobrevenidas estas tuvieron que cancelarse.

Conclusiones

- 1- Las mutaciones diseñadas para afectar a la interacción entre el dominio auto inhibitorio KA1 y el dominio quinasa de CHK1 dan lugar a formas activas y capaces de autofosforilarse.
- 2- Las mutaciones que inducen el desacoplamiento del dominio KA1 producen formas de CHK1 activo con una mayor estabilidad que aquellas diseñadas para desestabilizar por completo la estructura del dominio KA1.
- 3- La disparidad entre la estabilidad de ambos tipos de mutación y el hecho de que la principal diferencia de estos radique en el efecto que ejercen sobre la estructura de KA1, hace que este dominio se considere una zona candidata para la ubicación del degrón encargado de la interacción entre el CHK1 activo y los sistemas de ubiquinización.
- 4- Los resultados de nuestro estudio han de ser tomados con cautela debido a la incapacidad para obtener nuevos datos que apoyen estos resultados por la situación de emergencia decretada.

Conclusions

- 1- Mutations designed to affect the interaction between the KA1 self-inhibitory domain and the CHK1 kinase domain give rise to active forms capable of self-phosphorylation.

- 2- Mutations that induce decoupling of the KA1 domain produce forms of active CHK1 with greater stability than those designed to completely destabilize the structure of the KA1 domain.
- 3- The disparity between the stability of both types of mutation and the fact that the main difference between them lies in the effect that they exert on the structure of KA1, makes this domain a candidate area for the location of the degron sequence responsible for the interaction between active CHK1 and the ubiquitination system.
- 4- The results of our study must be taken with caution due to the inability to obtain new data to support our results because of the emergency situation declared.

Bibliografía

- Adams, R. R., Carmena, M., & Earnshaw, W. C.** (2001). Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends in cell biology*, *11*(2), 49-54.
- Alberts, B.** (2016). *Biología molecular de la célula* (6ª ed.). Barcelona: Omega.
- Bahassi, E. M., Ovesen, J. L., Riesenber, A. L., Bernstein, W. Z., Hasty, P. E., & Stambrook, P. J.** (2008). The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene*, *27*(28), 3977–3985.
- Baumann, P., & West, S. C.** (1998). Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends in biochemical sciences*, *23*(7), 247-251.
- Bertoli, C., Skotheim, J. M., & de Bruin, R. A. M.** (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *14*(8), 518–528.
- Byun, T. S., Pacek, M., Yee, M. C., Walter, J. C., & Cimprich, K. A.** (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes and Development*, *19*(9), 1040–1052.
- Chen, M.-S., Ryan, C. E., & Piwnica-Worms, H.** (2003). Chk1 Kinase Negatively Regulates Mitotic Function of Cdc25A Phosphatase through 14-3-3 Binding. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(21), 7488–7497.
- Delacroix, S., Wagner, J. M., Kobayashi, M., Yamamoto, K. I., & Karnitz, L. M.** (2007). The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes and Development*, *21*(12), 1472–1477.
- Emptage, R. P., Schoenberger, M. J., Ferguson, K. M., & Marmorstein, R.** (2017). Intramolecular autoinhibition of checkpoint kinase 1 is mediated by conserved basic motifs of the C-terminal kinase-associated 1 domain. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(46), 19024–19033.

- Feijoo, C., Hall-Jackson, C., Wu, R., Jenkins, D., Leitch, J., Gilbert, D. M., & Smythe, C.** (2001). Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: A role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing. *Journal of Cell Biology*, *154*(5), 913–923.
- Gong, E. Y., Hernández, B., Nielsen, J. H., Smits, V. A., Freire, R., & Gillespie, D. A.** (2018). Chk1 KA1 domain auto-phosphorylation stimulates biological activity and is linked to rapid proteasomal degradation. *Scientific reports*, *8*(1), 1-11.
- Gong, E. Y., Smits, V. A., Fumagallo, F., Piscitello, D., Morrice, N., Freire, R., & Gillespie, D. A.** (2015). KA1-targeted regulatory domain mutations activate Chk1 in the absence of DNA damage. *Scientific reports*, *5*(1), 1-13.
- Guo, C., Kumagai, A., Schlacher, K., Shevchenko, A., Shevchenko, A., & Dunphy, W. G.** (2015). Interaction of Chk1 with treslin negatively regulates the initiation of chromosomal DNA replication. *Molecular Cell*, *57*(3), 492–505.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G. C. M., Lukas, J., & Jackson, S. P.** (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nature Cell Biology*, *8*(1), 37–45.
- Jeong, S. Y., Kumagai, A., Lee, J., & Dunphy, W. G.** (2003). Phosphorylated Claspin Interacts with a Phosphate-binding Site in the Kinase Domain of Chk1 during ATR-mediated Activation. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(47), 46782–46788.
- 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.
- Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V., & Medema, R. H.** (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *Journal of Cell Biology* *185*(2), 193–202.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X. S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., ... & Donehower, L. A.** (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes & development*, *14*(12), 1448-1459.
- Namiki, Y., & Zou, L.** (2006). ATRIP associates with replication protein A-coated ssDNA through multiple interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(3), 580-585.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M.** (2009). Lehninger. Principios de Bioquímica. 5ª edición. Ed. Omega.
- Parrilla-Castellar, E. R., Arlander, S. J. H., & Karnitz, L.** (2004). Dial 9-1-1 for DNA damage: The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA Repair*, *3* (8–9), 1009–1014.
- Paulsen, R. D., & Cimprich, K. A.** (2007). The ATR pathway: Fine-tuning the fork. *DNA Repair*, *6*(7), 953–966.
- Peddibhotla, S., Lam, M. H., Gonzalez-Rimbau, M., & Rosen, J. M.** (2009). The DNA-damage effector checkpoint kinase 1 is essential for chromosome segregation and cytokinesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(13), 5159-5164.
- Petsalaki, E., Akoumianaki, T., Black, E. J., Gillespie, D. A. F., & Zachos, G.** (2011). Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation. *Journal of Cell Biology*, *195*(3), 449–466.
- Reyes-Turcu, F. E., Ventii, K. H., & Wilkinson, K. D.** (2009). Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annual review of biochemistry*, *78*, 363-397.
- Shimada, M., Niida, H., Zineldeen, D. H., Tagami, H., Tanaka, M., Saito, H., & Nakanishi, M.** (2008). Chk1 Is a Histone H3 Threonine 11 Kinase that Regulates DNA Damage-Induced Transcriptional Repression. *Cell*, *132*(2), 221–232.

- Smits, V. A., Cabrera, E., Freire, R., & Gillespie, D. A.** (2019). Claspin–checkpoint adaptor and DNA replication factor. *The FEBS journal*, 286(3), 441-455.
- Smits, V. A. J., & Gillespie, D. A.** (2015). DNA damage control: Regulation and functions of checkpoint kinase 1, *FEBS Journal*, 282(19), 3681–3692.
- Strieter, E. R., & Korasick, D. A.** (2012). Unraveling the complexity of ubiquitin signaling. *ACS chemical biology*, 7(1), 52-63.
- Zachos, G., Rainey, M. D., & Gillespie, D. A.** (2003). Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects. *The EMBO journal*, 22(3), 713-723.
- Zachos, G., Rainey, M. D., & Gillespie, D. A. F.** (2005). Chk1-Dependent S-M Checkpoint Delay in Vertebrate Cells Is Linked to Maintenance of Viable Replication Structures. *Molecular and Cellular Biology*, 25(2), 563–574.
- Zhang, Y. W., Brognard, J., Coughlin, C., You, Z., Dolled-Filhart, M., Aslanian, A et al.** (2009). The F box protein Fbx6 regulates Chk1 stability and cellular sensitivity to replication stress. *Molecular cell*, 35(4), 442-453.