

## *ARTÍCULO DE REVISIÓN*

### Función y regulación de Wee1, historia y avances más recientes

## ARTÍCULO DE REVISIÓN

# FUNCIÓN Y REGULACIÓN DEL MODULADOR NEGATIVO DEL CICLO CELULAR Wee1, UNA VISIÓN HISTÓRICA Y AVANCES MÁS RECIENTES

Mingyar N. López-Hernández (1), Estefany Damaris Guerrero-Molina (1),  
Samantha Romero-Rodríguez (2), Jorge M. Vázquez-Ramos\* (1)

(1) Facultad de Química, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México. (2) PPD, parte de Thermo Fisher Scientific, Ciudad de México, México

\*Autor de correspondencia E-mail: [jorman@unam.mx](mailto:jorman@unam.mx)

## RESUMEN

Wee1 es una cinasa que regula negativamente la progresión del ciclo celular mediante la fosforilación de un residuo de tirosina altamente conservado en las cinasas dependientes de ciclina (CDKs), cuya actividad es necesaria para la progresión del ciclo celular. Wee1 se descubrió hace más de 50 años en levaduras de fisión, cuando mutantes en el gen mostraron células con un fenotipo pequeño (*wee*), ya que éstas avanzaron prematuramente a la mitosis, incluso con DNA dañado, y fueron incapaces de detener la progresión del ciclo celular, por lo que se dividieron a un menor tamaño. Wee1 se ha descrito en un gran número de eucariontes y se ha determinado que, en la mayoría de ellos, controla la transición G2/M, además numerosos experimentos han demostrado que Wee1 es necesaria para la salida de mitosis y la transición G1/S; sin embargo, no existe una revisión sistemática de la función de Wee1 en cada transición del ciclo celular. En esta revisión se describen los experimentos que establecieron que Wee1 es un regulador clave de la transición G2/M y el papel de Wee1 en la salida de mitosis y en la transición G1/S, donde la actividad de Wee1 evita el inicio desregulado de la replicación y daño en el DNA. Además, se describe en cada punto de regulación, los principales mecanismos que han sido descritos para favorecer la activación o la inactivación de Wee1. Finalmente, se comenta de qué manera se ha aprovechado el papel de Wee1 en las diferentes transiciones del ciclo celular para generar estrategias para el tratamiento del cáncer.

### PALABRAS CLAVE

regulación del ciclo celular,

CDKs,

regulación de Wee1,

tratamiento de cáncer

## ABSTRACT

Wee1 is a kinase that negatively regulates cell cycle progression by phosphorylating a highly conserved tyrosine residue in cyclin dependent kinases (CDKs), whose activity is required for cell cycle progression. Wee1 was discovered more than fifty years ago in fission yeast, when mutants in its gene showed a “wee” phenotype, as they advanced prematurely to mitosis, even with damaged DNA, and were unable to stop cell cycle progression, thus dividing at a smaller size. Subsequently, Wee1 was described in many eukaryotes, and it has been determined that, in most of them, it controls the G2/M transition. In addition, many experiments have shown that Wee1 is required for mitosis exit and the G1/S transition; however, there is no systematic review of the function of Wee1 in each cell cycle transition. In this review we describe the experiments that established that Wee1 is a key regulator of the G2/M transition, we also review the role of Wee1 in mitosis exit and in the G1/S transition, where Wee1 activity avoids deregulated initiation of replication and DNA damage. In addition, we describe at each point of regulation, the main mechanisms that have been described to favor the activation or inactivation of Wee1. Finally, we review how the role of Wee1 in the different transitions of the cell cycle has been exploited to generate strategies for the treatment of cancer cells.

### KEY WORDS

cell cycle  
regulation,  
  
CDKs,  
  
Wee1 regulation,  
  
cancer therapy

## El ciclo celular

La serie de eventos que permiten la duplicación de las células eucariontes se conoce como ciclo celular. En éste, la mayoría de los componentes celulares son replicados continuamente; sin embargo, el material genético que se encuentra presente debe ser duplicado una vez por ciclo. Esto ocurre en una etapa discreta llamada fase de síntesis (S), mientras la distribución de los componentes duplicados de una célula madre a una hija ocurre durante la mitosis o fase M. En general, el ciclo celular contiene fases adicionales, conocidas como fases intermediarias, o “gaps” entre las fases S y M. La primera fase “gap”, G1, ocurre antes de la fase S, mientras que G2 ocurre antes de la fase M. Durante estos “gaps” ocurre el crecimiento celular y también se perciben señales intracelulares y extracelulares que permitirán una división celular exitosa (1).

Para el control del ciclo celular, proteínas cinasas, fosfatasas y proteasas especializadas han evolucionado para funcionar como interruptores moleculares y en consecuencia imponer un modo gradual en la progresión de los procesos de duplicación y repartición del DNA durante la mitosis (2). Una familia de proteínas cinasas que está altamente conservada entre todos los eucariontes y que se encarga de fosforilar un gran número de sustratos, permitiendo con ello la progresión del ciclo, es la familia de cinasas dependientes de ciclina (CDKs), las cuales requieren de la asociación de una proteína ciclina (Cyc) como primer paso para modular

positivamente su actividad. De manera similar a otras cinasas, para su activación total, las CDKs requieren de la fosforilación de un residuo de treonina que se encuentra conservado en el asa o “loop” de activación de la cinasa, una región que dependiendo de su conformación puede ocluir el acceso al sitio activo (3). La fosforilación del residuo es mediada por una cinasa activadora de CDKs (CAK), cuya actividad parece ser constitutiva a lo largo de todo el ciclo celular. La CAK también pertenece a la familia de las CDKs y en animales está formada por el complejo CDK7/CycH (4, 5).

En humanos, en respuesta a señales antiproliferativas, la actividad cinasa de los complejos CDK/Cyc se puede modular negativamente por la asociación de proteínas pertenecientes a dos familias de inhibidoras de CDKs: CIP/KIP (CDK *interacting protein/kinase inhibitory protein*) e INK4 (*Inhibitor of CDK4*). La familia de proteínas CIP/KIP está conformada por las proteínas p21, p27 y p57, mientras que la familia de inhibidores INK4 está conformada por p15, p16, p18 y p19; la familia INK inhibe particularmente a complejos CDK/Cyc que participan en la transición G1/S, lo cual contrasta con el mayor rango de acción de la familia CIP/KIP, que es capaz de inhibir complejos CDK/Cyc que participan durante todo el ciclo celular (Revisado en 6).

### La familia Wee1

Además de la asociación de proteínas que modulan negativamente la actividad cinasa de las CDKs, esta

actividad también se puede modular negativamente por la fosforilación de un residuo de treonina (T) y uno de tirosina (Y) que están altamente conservados en las CDKs que participan en la regulación del ciclo celular, y que en la CDK1 de humano, la CDK más importante para el control de la mitosis, corresponden a las posiciones 14 y 15 respectivamente. La fosforilación de la Y15 está mediada por la proteína Wee1A (de aquí en adelante Wee1) (7-9), una tirosin-cinasa que se encuentra altamente conservada en todos los eucariontes y cuya función es medular para coordinar el avance correcto del ciclo celular. Por otra parte, la fosforilación de la T14 está mediada por otro miembro de la familia Wee1, la cinasa inhibidora de cdc2 asociada a membrana, específica para tirosina y treonina (Myt1), la cual, como su nombre lo indica, fosforila la T14 y la Y15 (10, 11). El último miembro que integra la familia de cinasas inhibidoras es la proteína Wee1B, la cual fosforila específicamente la Y15 y conserva una alta homología con la proteína Wee1A (12). La proteína Wee1B se expresa únicamente en los ovocitos, y su función, junto con la de Myt1, es fundamental para su desarrollo, ya que mediante la fosforilación de CDK1 en los residuos de T14 y Y15, ambas proteínas mantienen arrestados a los ovocitos en la profase de meiosis I, durante la vida reproductiva femenina, hasta que se promueve su crecimiento y maduración para quedar arrestados nuevamente en la metafase II; fase en la que pueden ser fertilizados y esto promueve la salida de meiosis (13-16). En esta etapa, la proteína Wee1B también inhibe la actividad cinasa del complejo CDK1/CycB, lo que promueve la degradación de la CycB y la salida de meiosis (17).

Wee1 es una cinasa atípica ya que, tanto a nivel de secuencia como de estructura, está más relacionada con cinasas de serinas y treoninas que con cinasas de tirosinas. Se ha sugerido que la familia de proteínas Wee1 pudo haber evolucionado de cinasas de serinas y treoninas, y algunas mutaciones específicas la convirtieron en una cinasa de tirosinas que actúa sobre CDKs (18). El origen de la especificidad de Wee1 por la fosforilación de la Y15 parece provenir de características específicas en el “loop” de activación y la presencia de un ácido glutámico en la posición 309 del “loop” rico en glicinas (región de la cinasa donde se asocia el ATP), lo cual, por un impedimento estérico, desfavorecería la fosforilación de la T14 que precede a la Y15 de CDK1 (18). En la posición equivalente al glutámico 309 de Wee1, Myt1 posee una serina, un aminoácido de cadena lateral más corta, lo cual podría explicar en parte porqué Myt1 también es capaz de fosforilar la T14 de CDK1, aunque esto deberá ser demostrado.

La fosforilación de la Y15 en la CDK no modifica su estructura ni tampoco inhibe la asociación del ATP, ya que éste se asocia de manera estable a la CDK, aunque en una configuración incompatible con la transferencia del fosfato y al sustrato. Por otra parte, la fosforilación de la Y15 es un impedimento estérico en la CDK, tanto por carga como por espacio, para que el sustrato se asocie a la CDK para su fosforilación. No se ha determinado como es que la fosforilación de la T14 de la CDK inhibe su actividad; sin embargo, se propone que ésta bloquearía aún más la unión del sustrato y además impediría la unión o la configuración adecuada del ATP (19).

En animales, los primeros estudios sobre Wee1 evidenciaron que su actividad es importante para regular la transición G2/M; sin embargo, también aparecieron reportes que sugirieron su participación en la regulación de otras fases del ciclo celular, principalmente la transición G1/S. Recientemente se han podido dilucidar de manera fina los mecanismos bioquímicos de la regulación de Wee1 sobre el ciclo celular y se ha demostrado que Wee1 participa en cada transición del ciclo celular; sin embargo, no se ha realizado una revisión sistemática de la función de Wee1 en cada transición.

Dada la importancia de la regulación del ciclo celular para mantener el tamaño, forma y función de los diferentes órganos y estructuras que conforman a los animales y evitar la aparición de enfermedades como el cáncer, aquí revisamos aquellos experimentos que llevaron al descubrimiento de Wee1 como un regulador clave del ciclo celular en animales, y también los avances más recientes en el campo y de qué manera se ha aprovechado el conocimiento sobre la regulación del ciclo celular por Wee1 para generar terapias contra el cáncer.

### El descubrimiento de Wee1

En 1974, el descubridor de Wee1, Paul Nurse trabajaba en el laboratorio del doctor Murdoch Mitchison en la Universidad de Edimburgo, Escocia y la investigación se enfocaba en describir a los genes que controlan el ciclo celular. Para lograrlo, generaban mutantes termosensibles del ciclo de división celular (cdc) en *Schizosaccharomyces pombe*, es decir, levaduras que después de ser mutagenizadas no se pudieran dividir a una alta temperatura (la temperatura de restricción), la cual no impedía el crecimiento de las levaduras silvestres. *S. pombe* es un microorganismo ideal para dichos estudios, ya que tiene forma de varilla alargada y conforme progresa en el ciclo celular, aumenta de tamaño de manera longitudinal y se divide a un tamaño constante. Paul



Nurse observó una mutante que se dividía a un menor tamaño al ser llevada a la temperatura de restricción. Con el fin de reflejar el origen escocés del trabajo, decidieron utilizar la palabra “wee” para nombrar a la mutante, ya que esta palabra se usa particularmente en Escocia para referirse a algo pequeño (20-22).

Inicialmente se pensó que Wee1 no fosforilaba a Cdc2, la única CDK en *S. pombe* que controla la progresión del ciclo celular, ya que levaduras en donde *wee1* estaba mutada mantuvieron a Cdc2 fosforilada en la Y15 (23). Posteriormente, se descubrió que Mik1 (*mitosis inhibitory kinase*), una cinasa homóloga a Wee1, también fosforila a Cdc2 en la Y15 (24). La delección de *mik1*, a diferencia de la mutación de *wee1*, no mostró un fenotipo “wee”; sin embargo, la doble mutante llevada a la temperatura de restricción mostró un fenómeno conocido como catástrofe mitótica, en el que las células eran muy pequeñas y mostraban patrones anormales de segregación de cromosomas y formación del “septum”, la pared celular que se forma entre dos células hijas, a menudo generando células sin núcleo; adicionalmente, en esta doble mutante la CDK no se fosforilaba en la Y15. Cuando la doble mutante se incubó a la temperatura de restricción en presencia de hidroxurea, un inhibidor de la ribonucleótido reductasa que inhibe la síntesis de DNA por la depleción de nucleótidos y arresta a las células en la fase S, las levaduras avanzaron hacia una mitosis catastrófica sin haber duplicado su DNA. De manera similar, cuando la doble mutante *wee1mik1* se cruzó con una levadura que contenía una mutación en *cdc10*, un gen que codifica para un regulador positivo de genes necesarios para la transición G1/S, la triple mutante entró a mitosis, contrastando con el arresto en G1 de la mutante *cdc10* (25-28). El avance hacia mitosis tanto de la doble mutante *wee1mik1* en presencia de hidroxurea, como de la triple mutante *wee1mik1cdc10* sugirió que Wee1 y Mik1 funcionaban redundantemente para establecer un punto de control en la transición G2/M, que aseguraba que los procesos necesarios para una división celular exitosa se habían ejecutado correctamente.

Posteriormente, mediante ensayos de complementación en cepas de levaduras deficientes en *wee1*, se describieron los homólogos de Wee1 en humanos, *Drosophila* y *Xenopus* (29-31), mientras que homólogos de la proteína Mik1 no han sido encontrados.

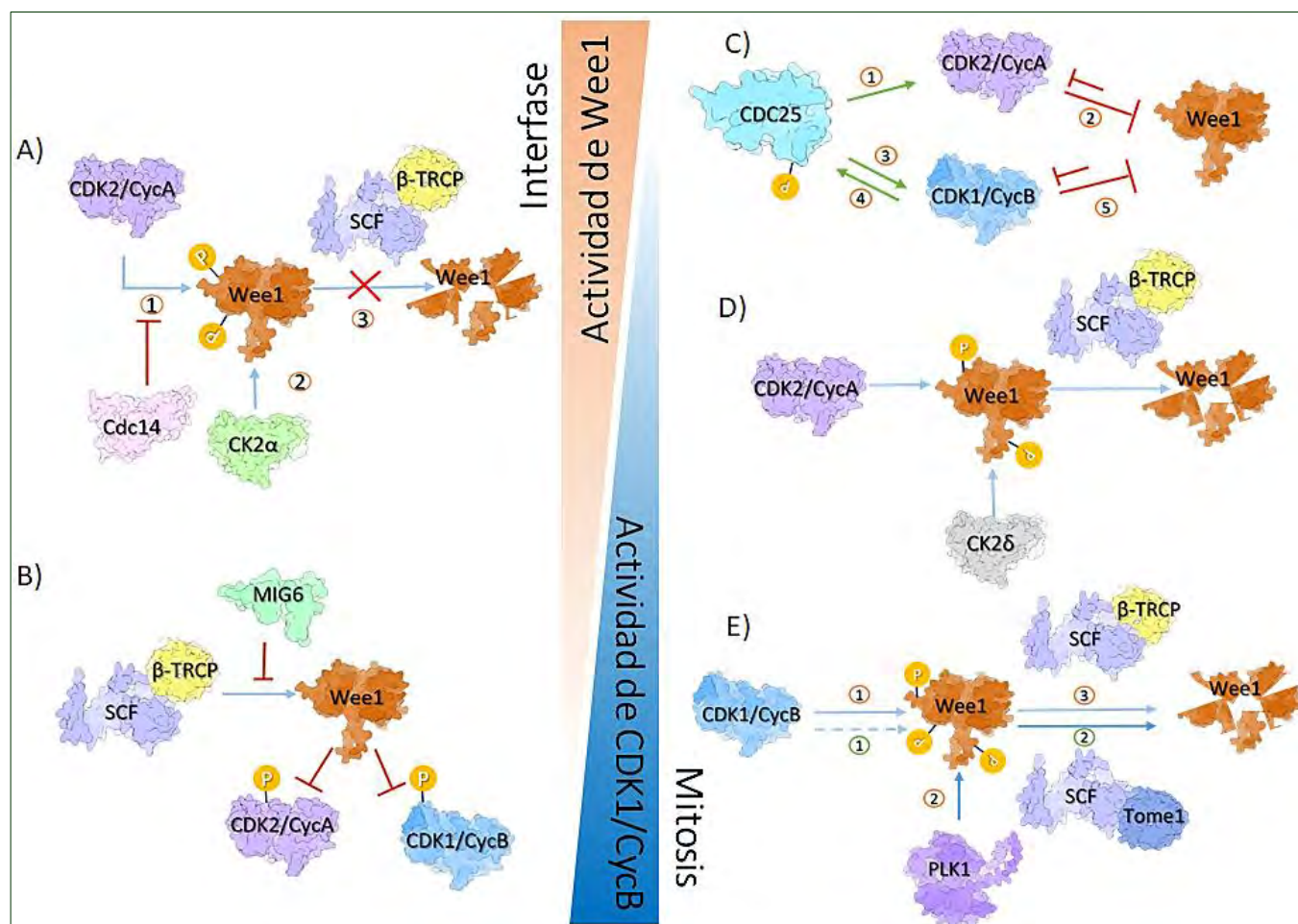
### Wee1 controla la transición G2/M

Una vez establecida la importancia de Wee1 para el control del ciclo celular en levaduras y dado que se encontró que Wee1 está altamente conservada en eucariontes, se determinó si la regulación del ciclo

celular por Wee1 se conservaba en otros eucariontes. En vertebrados, la fosforilación de CDK1 en T14 y Y15 se observó en interfase, mientras que en la transición G2/M dicha fosforilación desapareció abruptamente, y esto se acompañó con un aumento de su actividad de cinasa (Fig. 1). Por otra parte, cuando las posiciones 14 y 15 de CDK1 de células HeLa se mutaron por aminoácidos no fosforilables, de manera similar a las levaduras de fisión con mutaciones en *wee1* y *mik1*, se observaron eventos mitóticos prematuros, como el desensamble de la lámina nuclear y la reorganización de la red de microtúbulos, eventos necesarios para la ruptura del núcleo y la división de las células respectivamente. Lo anterior permitió establecer que la fosforilación de la Y15 es un mecanismo que se conservó en la evolución, en la mayoría de los organismos, para regular la entrada a la mitosis. La mutación simple en la T14 no mostró ningún fenotipo, mientras que la mutación en la Y15 mostró un fenotipo mitótico solo tras una expresión prolongada y en muy pocas células, lo que sugirió cierto nivel de redundancia en la fosforilación de ambos sitios, aunque pareció más importante la fosforilación en la Y15 (32).

Cuando se analizó la actividad de Wee1 a lo largo del ciclo celular, ésta fue mayor en G2, lo que coincidió con la mayor fosforilación de CDK1 en la Y15; cuando las células avanzaron a la mitosis, la actividad de Wee1 y la fosforilación en CDK1 disminuyeron drásticamente (9, 31, 33, 34) (Fig. 1). Lo anterior permitió establecer que en la mayoría de los eucariontes, Wee1 regula la transición a la fase M fosforilando a CDK1 en la Y15 durante interfase, lo que evita el inicio prematuro de la mitosis, posteriormente, cuando la célula está en condiciones de dividirse, Wee1 es inactivado mediante la actividad de diferentes CDKs, que como se revisará más adelante, producen un “loop” de retroalimentación negativa, que provoca una mayor actividad de CDK1 y una menor actividad de Wee1 a medida que las CDKs aumentan la fosforilación sobre Wee1.

En la transición G2/M, para desplazar el equilibrio de la forma inactiva de CDK1 hacia la forma activa, se requiere a la fosfatasa CDC25, la cual se encuentra conservada en la mayoría de los eucariontes (Fig. 1C). CDC25 es una fosfatasa con actividad dual que remueve las fosforilaciones en la T14 y la Y15 de CDK1; en humanos existen tres isoformas (A, B y C), de las cuales inicialmente se pensó que CDC25A era importante para regular la transición G1/S y CDC25B y C para regular la transición G2/M (35-39); sin embargo, estudios posteriores han sugerido que las tres isoformas podrían regular tanto la transición G1/S como la transición G2/M (Para una revisión completa ver 40).



**Figura 1.** Wee1 controla la transición G2/M. **A)** En humanos, durante interfase, ①Wee1 es fosforilado por CDK2 en la S123, ②lo que promueve la fosforilación de Wee1 en la S121 por CK2α; ③esto promueve el reconocimiento de Wee1 por la proteína F-box β-TrCP, como parte del SCF, para su ubiquitinación y posterior degradación mediante el proteasoma; sin embargo, en interfase se requiere niveles altos de Wee1 para mantener inhibida a CDK1 y evitar una mitosis prematura, por lo que para tener niveles adecuados de Wee1, la actividad de la fosfatasa Cdc14 antagoniza las fosforilación en la S123. **B)** Adicionalmente, durante interfase, la proteína MIG6 compete con β-TrCP, lo que favorece la estabilización de Wee1 y promueve niveles adecuados de fosforilación en la Y15 de CDK1 y de CDK2. **C)** En la entrada a mitosis, ①la fosfatasa CDC25 favorece la desfosforilación de CDK2 en la Y15, ②lo que incrementa la actividad de CDK2 sobre Wee1 y ceba su inactivación; posteriormente, ③CDC25 favorece la desfosforilación de CDK1, ④lo que incrementa la actividad de CDK1 sobre CDC25 y favorece su activación, estableciendo un loop de retroalimentación positiva que favorece la activación de CDK1. ⑤Conforme aumenta la actividad de CDK1, ésta incrementa la fosforilación sobre Wee1 y activa los mecanismos que favorecen su inactivación, estableciendo un loop de retroalimentación negativa que eventualmente lleva a la inactivación de Wee1 y la mitosis. **D)** En la entrada a mitosis, la fosforilación de CDK2 sobre Wee1 promueve su inactivación mediante dos mecanismos. La fosforilación de la T239 en la región conocida como “Wee box” promueve directamente la inactivación de Wee1, mientras que la fosforilación en la S472 promueve el reconocimiento por β-TrCP; adicionalmente, la fosforilación en la S212 de Wee1 por CK2δ también promueve el reconocimiento por β-TrCP para su ubiquitinación y posterior degradación vía proteasoma. **E)** En mitosis, ①la fosforilación en la S123 de Wee1 por CDK1, ②promueve la fosforilación de la S53 por Plx1, ③lo que promueve la asociación de β-TrCP, la ubiquitinación de Wee1 y su degradación. Por otra parte, en humanos la proteína F-box Tome-1 promueve la degradación de Wee1, aunque no se ha determinado la cinasa que fosforila a Wee1 para promover el reconocimiento por Tome-1, sin embargo; es probable que de manera similar a *Xenopus*, ①CDK1 ceba el reconocimiento por ②Tome-1 para la ubiquitinación y posterior degradación de Wee1.

## La inactivación de Wee1

Acompañando la inactivación de Wee1 en la fase M se observó su hiperfosforilación, lo que sugirió que este era el mecanismo de inactivación. En su extremo amino Wee1 posee numerosos sitios blanco de fosforilación por CDKs (Tabla 1), e *in vitro*, el complejo CDK1/CycB1 fosforiló a Wee1; sin embargo, en Wee1 de humano y ratón esto no modificó su actividad (9, 41), mientras que en Wee1 de *Xenopus* la fosforilación si inhibió la actividad de la cinasa, por otra parte, además de la inactivación de Wee1 en mitosis, también se observó la degradación de la proteína (9).

La degradación de Wee1 depende de un complejo proteico con actividad de proteasa conocido como proteasoma, el cual requiere, en general, que las proteínas sean marcadas para su degradación y esto ocurre mediante la ubiquitinación de las proteínas. La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos cuya ligación a la proteína blanco de degradación depende de una serie de reacciones realizadas por enzimas conocidas genéricamente como E1, E2 y E3. El paso final de la reacción, que implica la transferencia de una ubiquitina (o más de una) al sustrato, es llevada a cabo por una ubiquitín ligasa (E3) (1).

En *Xenopus* se reportó que la degradación de Wee1 depende de la enzima E2 cdc34, la cual promueve la degradación de Wee1 después de que la fase S ha concluido (42), mientras que estudios tanto en *Xenopus* como en humano, sugieren que la presentación de Wee1 a cdc34 para su ubiquitinación, está mediada por la proteína con caja F (F-box) Tome-1 (*trigger of mitotic entry*) (Fig 1E), la cual pertenece al complejo ubiquitín ligasa E3 SCF, cuyo nombre se deriva de las proteínas que lo componen: Skp, Culina-1 y proteína con F-box. Las proteínas F-box son las encargadas de reconocer a las proteínas blanco de ubiquitinación y diferentes proteínas F-box se pueden intercambiar en el SCF para presentar diferentes sustratos (1).

En *Xenopus*, la asociación de Tome-1 a Wee1 requiere la fosforilación de la S38 en la cinasa, la cual es mediada por CDK1, y se ha reportado que la fosforilación desaparece cuanto se activa el “check-point” de replicación del DNA, lo que estabiliza a Wee1, detiene el ciclo celular y eventualmente permite la reanudación de la replicación. Interesantemente, Tome-1 es degradada al término de la mitosis mediante el APC<sup>cdh1</sup>/Ciclosoma (*Anaphase Promoter Complex*), una ubiquitín ligasa que promueve la degradación de proteínas al final de la mitosis y en G1 temprana. Se sugiere que la degradación de Tome-1 en dicha ventana de tiempo per-

mite la reacumulación de Wee1 al inicio del ciclo celular, en donde su presencia podría ser necesaria para contribuir a la irreversibilidad de la mitosis, como se revisará en una sección posterior (43-45).

Tome-1 no es la única proteína F-box que participa en la degradación de Wee1; tanto en *Xenopus* como en humanos, la proteína  $\beta$ -TrCP (“ *$\beta$ -transducin repeat-containing protein*”), como parte del SCF, participa en la degradación de Wee1. Similar a Tome-1, la asociación a  $\beta$ -TrCP requiere la fosforilación de Wee1 en diferentes sitios, aunque de manera particular, la fosforilación es cebada por una CDK que fosforila la S123 (Tabla 1), lo cual promueve la fosforilación de la S121 por la isoforma  $\alpha$  de la caseína cinasa 2 (CK2), una cinasa de serinas y treoninas que es activa constitutivamente durante el ciclo celular y que lo regula. La fosforilación de ambas serinas crea un primer fosfodegrón (señal para degradación) en Wee1 que promueve su recambio durante interfase (Fig. 1A) (46). Adicionalmente, la isoforma  $\delta$  de la CK1 fosforila a Wee1 en la S212 para promover su degradación directamente mediante  $\beta$ -TrCP durante la mitosis (Fig. 1D) (47).

La fosforilación en la S123 de Wee1 también genera un motivo de unión al dominio polo box (PBD) de la proteína Plx1 (*Polo-like protein*) que favorece la asociación entre las proteínas. Plx1 es una cinasa de serinas y treoninas cuya forma activa se acumula al inicio de la mitosis, y al igual que las CDKs es muy importante para el control del ciclo celular. La asociación de Plx1 a Wee1 promueve la fosforilación de la S53 de Wee1, lo que genera un segundo fosfodegrón en Wee1 que estimula su asociación a  $\beta$ -TrCP y su degradación al inicio de la mitosis (Fig. 1E) (46, 48, 49). Evidentemente, la fosforilación de múltiples sitios en el extremo amino de Wee1 de humano promueve su degradación en la entrada a mitosis permitiendo con ello la activación de CDK1 (Tabla 1).

No solo la fosforilación del N-terminal de Wee1 promueve su degradación; en el “loop” de activación de la cinasa, la fosforilación en la S472 promueve la asociación con  $\beta$ -TrCP y la degradación de Wee1. Se sugiere que esta fosforilación podría ser mediada por el complejo CDK2/CycA, ya que la fosforilación requirió a la L483, que forma parte de un motivo RxL, el cual es necesario para la asociación del complejo CDK2/CycA a sus sustratos (50, 51, 52) (Fig. 1A). La degradación mediante la fosforilación en la S472 es antagonizada por la proteína MIG6/ ERFFI1 (*mitogen-inducible gene 6/ ErbB receptor feedback inhibitor 1*), una proteína de andamiaje que inhibe la vía de transducción de seña-



les mediante el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) y que generalmente se reconoce como un inhibidor de la señalización mitótica y la proliferación celular (revisado en 53). MIG6 se asocia al dominio cinasa de Wee1 para promover su estabilidad, compitiendo con  $\beta$ -TrCP por la asociación a Wee1 y por lo tanto previniendo su degradación por el proteasoma (Fig. 1B). La presencia de MIG6 es un control importante para evitar una entrada prematura a mitosis, e interesantemente también para la salida de ésta (54).

Oponiéndose a las fosforilaciones que promueven la degradación de Wee1, en humanos, la fosfatasa Cdc14, que en levaduras de gemación es importante para la desfosforilación de múltiples proteínas en la salida de mitosis, estabiliza a Wee1 en interface removiendo las fosforilaciones en las serinas 123 y 139 (Fig. 1A) (55, 56). Cdc14 también remueve fosforilaciones en Cdc25, la fosfatasa que se opone a la actividad de Wee1, evitando con ello la activación de Cdc25 y que esta remueva prematuramente las fosforilaciones en la T14 y Y15 de CDK1 (57).

La fosforilación del N-terminal de Wee1 no solo promueve la degradación de la cinasa, en *Xenopus* se reportó que la fosforilación de la T186 por el complejo CDK1/CycB en una región que se denominó “Wee box”, la cual comprende 8 aminoácidos, promueve la inactivación de Wee1. Los primeros tres aminoácidos de la caja, una asparagina, seguida de una isoleucina y luego de otra asparagina, conforman el motivo NIN, el cual es importante para la interacción intramolecular del extremo amino regulatorio (NRD) de Wee1 con su dominio catalítico (CD), lo que favorece una conformación del CD que fosforila a CDK1. La otra parte de la “Wee box” es un motivo de fosforilación por CDKs, que al ser fosforilado desfavorece la interacción entre el NRD y el CD (58). La “Wee box” también esta conservada en otros organismos como *Drosophila* y pollo; de hecho, en humanos se ha demostrado que la fosforilación del residuo equivalente a la T186, la T239 está implicada en la inactivación de Wee1 para la entrada a mitosis (Tabla 1) (51, 58).

### **La fosforilación de Wee1 en múltiples sitios es importante para su regulación como un sistema biestable**

En *Xenopus* se ha demostrado que la presencia de numerosos sitios de fosforilación en Wee1 contribuyen a que la inactivación de Wee1 sea ultrasensible, es decir, con una cinética sigmoidal y no lineal de inactivación, la ultrasensibilidad a su vez es una característica necesaria para el comportamiento

biestable de Wee1, es decir, que Wee1 sea activo durante interfase e inactivo durante mitosis, sin niveles intermedios de actividad (59, 60). La ultrasensibilidad permite que pequeñas fluctuaciones en la fosforilación de Wee1 no la inactiven de manera prematura, sino hasta que se alcanza un umbral de fosforilación en la transición G2/M.

En el NRD de Wee1 de diferentes especies existen numerosos sitios de fosforilación, sin que exista una conservación de la posición de los sitios entre especies, lo que sugiere que es más importante el número y no la posición de las fosforilaciones en Wee1 (60). En *Xenopus* se ha demostrado que existen sitios de fosforilación que no son necesarios para la inactivación; sin embargo, su presencia permite la inactivación ultrasensible de Wee1, por lo que se ha sugerido que existen sitios que actúan como señuelos de la actividad de las CDK, que amortiguarían la inactivación de Wee1, por lo que la conservación de la posición de los sitios no sería importante como sí lo sería su presencia (60). Tendrá que ser demostrado que el número de sitios de fosforilación en Wee1 de humanos y otros organismos contribuyen a la inactivación ultrasensible de Wee1, ya que esto solo se demostró para *Xenopus*.

Por otra parte, en *Saccharomyces cerevisiae* se ha observado que la fosforilación de Wee1 por el complejo Cdc28/Clb2 (CDK1 y una CycB respectivamente) promueve la activación de Wee1, la fosforilación de la Y15 de Cdc28 y la formación de un complejo Cdc28/Clb2/Wee1 que mantiene a la CDK inactiva antes de mitosis; posteriormente, la desfosforilación de Cdc28 por Mih1, la fosfatasa homóloga a CDC25 de eucariontes superiores, favorecería la activación del complejo Cdc28/Clb2 y por lo tanto la hiperfosforilación de Wee1 y su inactivación (61). Un mecanismo similar de regulación entre CDK1 y Wee1 se demostró en humanos. En presencia de concentraciones bajas de ciclina B, durante interfase, se favoreció la activación de Wee1, probablemente por la fosforilación de Wee1 por los complejos CDK1/CycB1 formados; a medida que aumentó la cantidad de CycB, lo que ocurre cuando las células se acercan a mitosis, la actividad del complejo se mantuvo constante, hasta que en cierto umbral de CycB, el complejo CDK1/CycB1 fue totalmente activo. Como en levaduras, también fue necesaria la actividad de CDC25 para favorecer la activación de CDK1 (62).

En esta mecánica, el “loop” de retroalimentación que existió entre Wee1 y CDK1 influyó en el comportamiento ultrasensible de la activación de CDK1; se sugiere que entre más aumenta la actividad de CDK1 por el aumento de CycB, más se favorecería



la activación de Wee1 y por consiguiente mantendría en niveles bajos de actividad los cada vez mayores niveles de complejo CDK1/CycB. Por otra parte, CDC25 permitiría desplazar el equilibrio para la inactivación de Wee1, promoviendo la activación de CDK1/CycB y en consecuencia la hiperfosforilación de Wee1 y su inactivación (62). Entonces, diferentes mecanismos que permiten que la inactivación de Wee1 sea ultrasensible también contribuyen a que la activación de CDK1 sea ultrasensible y esto a su vez permite que la transición a la mitosis sea un proceso biestable.

### CDK2/CycA actúa como un cebador para la inactivación de Wee1 en mitosis

Una pregunta interesante ha sido cómo comienza la inactivación de Wee1, ya que su inactivador, el complejo CDK1/CycB, se encuentra inhibido en G2, así que se ha postulado que un complejo CDK/Cyc cuya actividad inicia antes de la fase G2, actúa como cebador para la inactivación de Wee1 (63). Diversos estudios han sugerido que el complejo CDK2/CycA es el encargado de cebar la inactivación de Wee1 (Fig. 1C), ya que en células de *Xenopus* o de huma-

| Fosforilación | Organismo      | Cinasa              | Función propuesta  | Referencia |
|---------------|----------------|---------------------|--|------------|
| S38           | <i>Xenopus</i> | CDK1                | Degradación por Tome-1   | 43         |
| S123          | Humano         | CDK1/2              | Promueve la fosforilación de la S121 por CK2 $\alpha$ y de la S53 por Plx1 | 46         |
| S123 y S121   | Humano         | CDK2 y CK2 $\alpha$ | Promueve la degradación por $\beta$ -TrCp                                  | 46         |
| S123 y S53    | Humano         | CDK1 y Plx1         | Promueve la degradación por $\beta$ -TrCp                                  | 46         |
| S212          | Humano         | CK2 $\delta$        | Promueve la degradación por $\beta$ -TrCp                                  | 47         |
| S472          | Humano         | CDK2                | Promueve la degradación por $\beta$ -TrCp                                  | 50         |
| T186          | <i>Xenopus</i> | CDK1                | Inactivación de Wee1   | 58         |
| T239          | Humano         | CDK2                | Inactivación de Wee1   | 51         |

**Tabla 1.** Principales fosforilaciones reportadas en Wee1 y efecto que tienen en la cinasa.

no, cuando se depletó o silenció a CycA o a CDK2, la cinasa que se asocia principalmente a CycA, las células no avanzaron a la mitosis, y esto se acompañó de un aumento en la fosforilación de la Y15 de CDK1 y de la inhibición de su actividad (64-67). Por el contrario, cuando se agregó CycA exógenamente a células de *Xenopus*, la fosforilación inhibitoria de CDK1 disminuyó y se favoreció la mitosis; de manera similar, cuando se agregó CycA exógenamente a extractos celulares que recapitularon la progresión del ciclo celular, se favoreció la inactivación de Wee1 y la activación del complejo CDK1/CycB1 (62, 68).

Debido a que CycA también regula la transición por la fase S (65), el arresto de las células en G2 debido al silenciamiento de CycA se puede atribuir a defectos en S y no realmente a una función en G2. Para descartar lo anterior, Hégarat *et al.* (69) indujeron específicamente la degradación de CycA en células que ya habían terminado la duplicación de su DNA, lo que provocó la disminución de las células en mitosis; sin embargo, esto se revirtió agregando un inhibidor de Wee1, aunque las células pasaron más

tiempo en metafase, lo que sugiere que la función de CycA en mitosis no solo sería inhibir a Wee1. A pesar de lo anterior, los experimentos confirmaron que los efectos observados en la transición G2/M debido al silenciamiento de CycA, se debieron a la función que tiene el complejo CDK2/CycA sobre Wee1 y no a la función del complejo en la fase S.

Además de Wee1, varios moduladores de la actividad de CDK1 en la transición G2/M podrían ser regulados por los complejos CycA/CDK2, como CDC25 o Plx1. Sin embargo, cuando se silenció la expresión de CycA en células HeLa, la sobreexpresión de las tres isoformas de CDC25 no revirtió el arresto de las células en G2; pero, el silenciamiento de Wee1 promovió la hipofosforilación de CDK1 en la Y15, restauró su actividad y, consecuentemente, el índice mitótico (64). Lo anterior sugiere que en la transición G2/M, la regulación de CycA/CDK sobre Wee1 es más importante que la regulación sobre CDC25.

Estudios en células de humanos sugieren que el complejo CDK2/CycA podría promover directa-

mente la inactivación de Wee1, mediante la fosforilación de la T239 en la “Wee box”, ya que la fosforilación de dicho residuo dependió de la presencia de un motivo RxL cercano al blanco de fosforilación, y cuando se mutó el motivo, disminuyó la asociación del complejo CDK2/CycA a Wee1, la fosforilación de la T239 y las células pasaron más tiempo en la transición G2/M. Por otra parte, como se mencionó previamente, la fosforilación en la S472, que promueve la degradación de Wee1, también dependió de un motivo RxL cercano al sitio de fosforilación, por lo tanto, el complejo CDK2/CycA estaría contribuyendo al menos por dos mecanismos a la inactivación de Wee1, para favorecer posteriormente su inactivación por el complejo CDK1/CycB (Fig. 1D) (50, 51).

Como se revisará en una sección posterior, en la transición G1/S, el complejo CDK2/CycA también es blanco de Wee1 (70), por lo que para poder iniciar la inactivación de Wee1 al inicio de G2, es necesario favorecer la activación del complejo CDK2/CycA. *In vitro*, la fosfatasa CDC25b activó eficientemente a los complejos CDK2/CycA (71), mientras que *in vivo*, la inhibición de las tres isoformas de CDC25 inhibió la activación de CDK2/CycA al inicio de G2 (72). Lo anterior sugiere que CDC25b es el activador que ayuda a los complejos CDK2/CycA a escapar de la inhibición de Wee1 para posteriormente promover su inactivación (Fig. 1C).

### Wee1 se relocaliza durante la mitosis

Otro mecanismo que contribuye a inhibir la actividad de Wee1 sobre los complejos CDK1/CycB, cuya localización y actividad es principalmente nuclear durante la mitosis, es la relocalización de Wee1 del núcleo al citoplasma. Durante interfase la localización de Wee1 es nuclear, y al inicio de la profase la proteína se relocaliza hacia el citoplasma, aunque la cinasa permanece en ciertas regiones del núcleo, lo que sugiere que la actividad de Wee1 se puede requerir tardíamente durante la mitosis, por ejemplo, para la salida de ésta, como se revisará en una sección posterior (1, 73).

En humanos, la relocalización de Wee1 del núcleo al citoplasma está mediada por la proteína CRM1 (*Chromosomal Maintenance 1*, también conocida como exportina), ésta regula la exportación de Wee1 mediante una secuencia de unión a CRM1 presente en la cinasa, la cual está conservada en Wee1 de diferentes organismos. La mutación de dos residuos en la secuencia de unión a CRM1 o la inhibición de CRM1 con leptomicina B, inhibió la relocalización de Wee1 al citoplasma; sin embargo, a pesar de que la relocalización de Wee1 en mitosis

sugiere que esto es necesario para la activación del complejo CDK1/CycB y la mitosis, la inhibición de la relocalización de Wee1 no provocó la inhibición de mitosis (51). Esto se podría explicar porque los complejos CycB1/CDK1 se activan inicialmente en el citoplasma, específicamente en los centrosomas, que son los centros organizadores de los microtúbulos en la célula. La activación de los complejos CycB1/CDK1 promueve su relocalización al núcleo, donde, si estuviera presente la actividad de Wee1, los inhibiría; sin embargo, como ocurre en interfase, los complejos CycB1/CDK1 pueden ser exportados del núcleo ya que durante la profase no se inhibe su exportación debido a que su actividad es necesaria en el citoplasma para remodelar el citoesqueleto y la separación de los centrosomas. En el citoplasma los complejos pueden ser activados nuevamente por CDC25, ya que la fosfatasa permanece en el citoplasma hasta la profase tardía (74). Concomitantemente, en el núcleo CycA/CDK2 puede promover la inactivación de Wee1, y eventualmente los complejos CycB1/CDK1 cada vez más activos en el citoplasma e importados al núcleo promoverían la inactivación de Wee1 y el inicio de la metafase. Si la exportación nuclear de Wee1 no es crítica para la ejecución de la mitosis, entonces es posible que Wee1 esté teniendo alguna función en el citoplasma durante la mitosis.

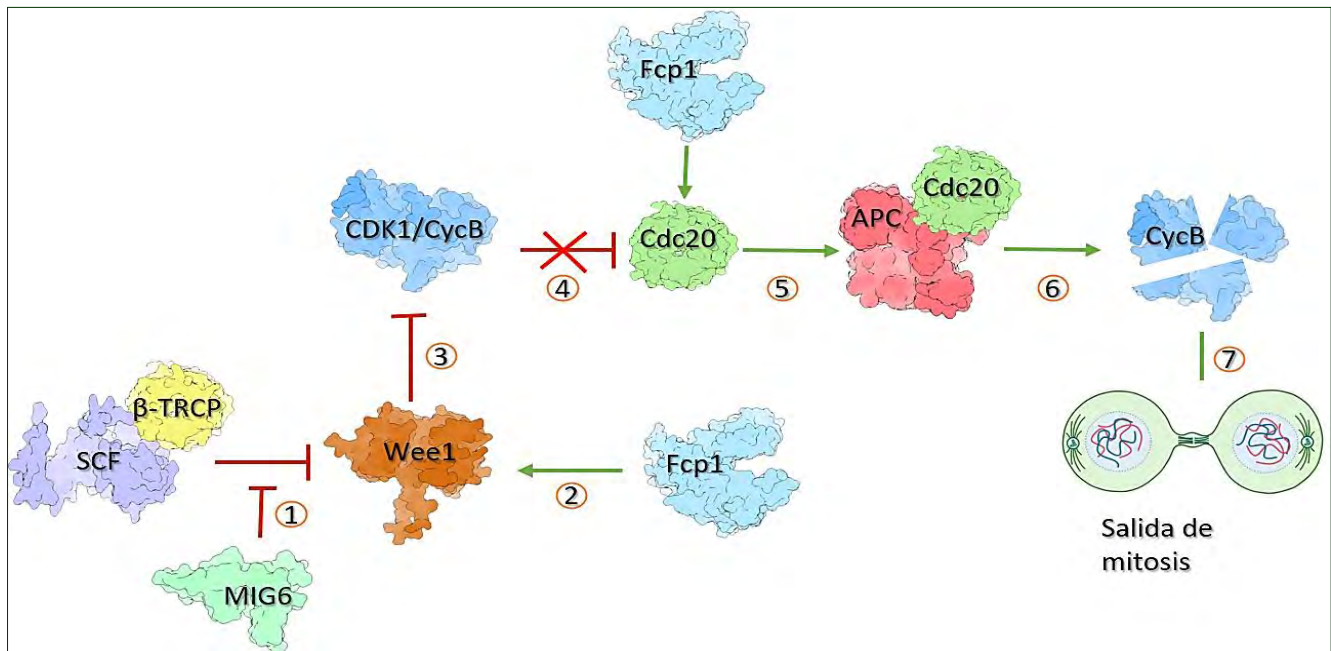
Recientemente se mostró la presencia de Wee1 en los centrosomas, así como la fosforilación en la Y15 de CDK1 asociada a estos durante interfase (75). Como se mencionó anteriormente, los complejos CycB/CDK1 se activan inicialmente en los centrosomas durante la profase, de hecho, en *S. cerevisiae* tanto la localización de Cdc2 y Cdc13 (CDK1 y un tipo de ciclina B respectivamente), como la actividad de Cdc2 en el cuerpo polar del uso, el organelo equivalente al centrosoma, son necesarias para la transición G2/M (76, 77). Se ha propuesto que en el centrosoma se regula el “timing” del compromiso a mitosis, regulando el balance entre las moléculas antimitóticas y promitóticas (78), entonces la presencia de Wee1 y su regulación sobre CDK1 en el centrosoma podría ser importante para evitar un compromiso prematuro a la mitosis, aunque esto deberá ser demostrado.

### Wee1 en la salida de mitosis y G1

Se ha sugerido que la actividad de Wee1 es necesaria para la salida de mitosis, ya que antes de que empezaran a decaer los niveles de CycB, un proceso necesario para la salida de mitosis relacionado con la inactivación de CDK1, decayó la actividad cinasa asociada a CDK1, lo cual se acompañó de una segunda ola de fosforilación en la Y15 de la cinasa,

posterior a la primera ola que se observó durante la transición de interfase a la mitosis (79). Los estudios sugieren que esta segunda ola de actividad de Wee1 permitiría inhibir la actividad del complejo CDK1/CycB1 sobre Cdc20, un activador del APC/C que promueve la degradación de CycB. Contrario a la fosforilación del APC/C por el complejo CDK1/CycB1, que estimula su actividad de ubiquitin-ligasa, la fosforilación de Cdc20 inhibe su asociación al APC/C por lo que al inhibir la actividad del complejo CDK1/CycB1 se promovería la asociación de Cdc20 al APC/C, la degradación de CycB y consecuentemente la salida de mitosis (Fig. 2). Interesantemente, durante la segunda ola de fosforilación en la Y15, reaparece la fosforilación en la S287 de CDC25C, que inhibe su actividad de fosfatasa, lo que favorecería la fosforilación de la Y15 (79-82).

Para permitir la reactivación de Wee1 en la salida de mitosis es necesario contrarrestar los mecanismos que iniciaron la inactivación de Wee1 en la entrada a mitosis. Se ha demostrado que la actividad de Fcp1, una fosfatasa esencial para regular el grado de fosforilación del dominio carboxilo terminal de la RNA polimerasa II, también participa en la salida de mitosis mediante la desfosforilación de diferentes sustratos, entre ellos Wee1. Se propone que Fcp1 remueve la fosforilación de la T239 de Wee1, lo que permite la reactivación de la cinasa; adicionalmente, Fcp1 también actúa sobre Cdc20, lo cual podría promover su asociación al APC/C y la degradación de CycB1 (83). Existen múltiples mecanismos que aseguran la inactivación de Wee1 en la entrada a mitosis, por lo que la reactivación de Wee1, dependiente de la desfosforilación de la T239, podría no ser suficiente para estabilizar la



**Figura 2.** Wee1 participa en la salida de mitosis. ①En la salida de mitosis MIG6 compite con β-TrCP para estabilizar a Wee1, ②mientras que la fosfatasa Fcp1 antagoniza la fosforilación de Wee1 en la T239, para evitar su inactivación. ③La estabilización y reactivación de Wee1 promueve la fosforilación de la Y15 de CDK1 y su inhibición, ④lo que promueve la pérdida de fosforilación en Cdc20, el activador del APC. ⑤La forma hipofosforilada de Cdc20 se puede asociar al APC y activarlo, adicionalmente, Fcp1 también actúa sobre Cdc20 para favorecer su asociación con el APC. Finalmente, ⑥la activación del APC promueve la degradación de CycB y esto la ⑦salida de mitosis.

actividad de Wee1 en la salida de mitosis. Se ha propuesto que MIG6, quien antagoniza la degradación de Wee1 evitando la asociación de la proteína F-box β-TrCp, favorecería la estabilización de la proteína en la salida de mitosis, ya que células deficientes en MIG6 mostraron un retraso en la salida de mitosis, lo cual se acompañó de un aumen-

to en la actividad de CDK1 (Fig. 2) (54). Dado que, para la salida de mitosis, la actividad de Wee1 solo se necesitaría en una pequeña ventana de tiempo, a diferencia de la actividad necesaria antes de la entrada a mitosis, es posible que los mecanismos mencionados sean suficientes para la estabilización de la actividad de Wee1 en la salida a mitosis.



Cuando se inhibió la expresión del mensajero de *cdc20*, se retrasó la salida de mitosis y aumentó la fosforilación en la Y15 de CDK1; por otra parte, el retraso en la salida aumentó en presencia de una mutante no fosforilable de CDK1 en T14 y Y15 o cuando Wee1 también se depletó. Lo anterior sugiere que Wee1 participa en un mecanismo de respaldo que permite la salida de mitosis si falla alguno de los mecanismos que normalmente la promueven. La redundancia en los mecanismos de control del ciclo celular se debe a la importancia del proceso, ya que, por ejemplo, para organismos unicelulares, que las células no se dividan significaría la pérdida de la progenie (84).

Por otra parte, cuando se indujo la salida de mitosis mediante la inhibición del complejo CDK1/CycB, sin la degradación de CycB, las células regresaron a mitosis 30 minutos después de remover la inhibición del complejo; sin embargo, al remover el inhibidor una hora después, aumentó la fosforilación en T14 y Y15 de CDK1 y muy pocas células regresaron a mitosis a pesar de la presencia de CycB1; adicionalmente, el retorno a mitosis ocurrió en todas las células si estas salieron de mitosis con una versión no fosforilable de CDK1 en las posiciones 14 y 15 o si se inhibió la actividad de Wee1 y de Myt1. Estos experimentos sugieren que Wee1 y Myt1 forman parte de un sistema de respaldo que evita el retorno a mitosis cuando CycB no es degradada. La concurrencia de dos momentos celulares diferentes es catastrófica, como lo demuestra el hecho de que las células que son revertidas a mitosis en la fase G1 tardía sufren apoptosis, por lo que existen mecanismos redundantes que aseguran que dos fases del ciclo celular no ocurran al mismo tiempo (85).

### Wee1 y el control de la transición G1/S

Estudios en humano y *Xenopus* identificaron que además de CDK1, CDK2 también es blanco de regulación por Wee1. La fosforilación en la Y15 de CDK2 aumentó hacia la fase S y posteriormente se perdió en la entrada a la fase M, de manera similar a la fosforilación en la Y15 de CDK1. La fosforilación en la Y15 de CDK2 inhibió su actividad de cinasa, y debido a que la actividad de CDK2 en asociación con CycA es fundamental para la transición G1/S, principalmente para promover la replicación del DNA, se ha sugerido que Wee1 podría controlar la transición G1/S de manera análoga a como controla la transición G2/M (70, 86, 87).

En células de ratón, cuando CDK2 se sustituyó por una mutante que no podía ser fosforilada ni por Wee1 ni por Myt1 (CDK2AF), la actividad de CDK2 aumentó prematuramente y esto correlacionó con un inicio prematuro de la replicación del DNA.

Interesantemente, este fenotipo solo se observó cuando las células provenían de un estado quiescente (88). En células de humano, la mutante CDK2AF inició prematuramente la replicación del DNA, además, las células exhibieron daño en el DNA durante la fase S e inestabilidad genómica, también incrementó el cebado de los orígenes de replicación y disminuyó la velocidad de la horquilla de replicación, lo que también se observó cuando se silenció la expresión de Wee1 (89, 90).

El daño en el DNA en las células depletadas de Wee1 se revirtió cuando también se depletó el factor 1 de licenciamento de la cromatina y la replicación (CDT1) o la proteína MCM2 (*mini-chromosome maintenance*), ambas proteínas importantes para el inicio y la elongación de la replicación, lo que sugirió que el daño inducido por la ausencia de Wee1 estaba asociado a la replicación del DNA en la fase S; interesantemente, el daño en el DNA también se revirtió cuando se depletó a CDK1 o a CDK2, lo que sugirió que el daño generado se debió a la desregulación de las cinasas durante la replicación (91).

Se propone que la disminución en la velocidad de la replicación cuando se inhibe a Wee1 se debe al aumento en el número de orígenes de replicación activados; esto consume rápidamente los componentes necesarios para la replicación, como el desoxiATP (dATP), que disminuye su concentración cuando Wee1 es inhibido (92). La disminución de los niveles de dATP también se podría deber a la degradación desregulada de la subunidad 2 de la ribonucleótido reductasa (RRM2), la enzima encargada de la síntesis de desoxinucleótidos (dNTPs), ya que cuando Wee1 es inhibida aumenta la fosforilación en la T33 de RRM2 y su degradación. Normalmente, la fosforilación de la T33 promueve la degradación de la proteína en la fase G2 mediante la proteína F-box Cyc F; la fosforilación está mediada tanto por CDK1 como por CDK2, por lo que se propone que la actividad de Wee1 en la transición G1/S evita la degradación prematura de la subunidad 2 de la RNR, lo que promovería niveles óptimos de dNTPs en la fase S (Fig. 3) (93, 94).

Wee1 también podría estar regulando la transición G1/S favoreciendo un recambio adecuado de CycE, una ciclina que se asocia a CDK2 para promover eventos tempranos de la replicación del DNA (1). En embriones de *Xenopus* la sobreexpresión de Wee1 provocó la estabilización de CycE, mientras que en células humanas la mutante CDK2AF mostró una mayor degradación de CycE. Se infiere que la fosforilación por Wee1 de CDK2 en la Y15 regula la degradación de CycE, aunque aún no es claro si



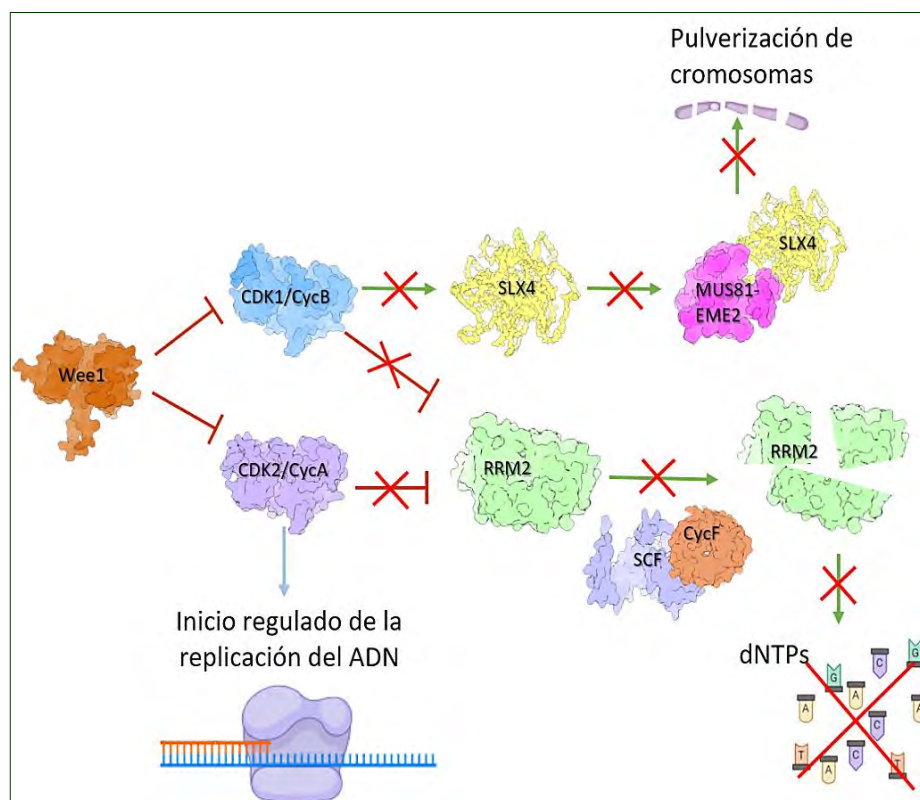
esto se debe a la inhibición de la actividad de CDK2, ya que en los embriones de *Xenopus* que sobreexpresaron a Wee1, esta actividad es similar a la actividad detectada en los embriones control, a pesar de que aumentó la fosforilación en la Y15 de CDK2 en las sobreexpresantes de Wee1 (89, 95).

Además del estrés replicativo generado por la ausencia de actividad de Wee1 en la fase S, también se genera daño en el DNA mediante nucleasas, cuyo blanco son las estructuras intermediarias que se generan durante la replicación, que requieren su resolución por medio de la reparación. MUS81-EME2 es una nucleasa que escinde intermediarios replicativos persistentes durante la fase M, promoviendo la síntesis reparativa del DNA fuera de la fase S y asegurando con esto la correcta segregación de los cromosomas (96, 97). Durante la fase S, Wee1 inhibe a CDK1 para evitar que esta fosforile prematuramente a la endonucleasa de andamiaje SLX4, ya que, cuando Wee1 es inhibida, su fosforilación promueve su asociación con MUS81-EME2 y reubica este complejo hacia los intermediarios de la replicación, lo que promueve la pulverización de los cromosomas (Fig. 3) (92, 98).

Por lo tanto, la actividad de Wee1 sería necesaria al menos en dos puntos de la fase S, al principio, para mantener niveles de actividad adecuados en CDK2, lo que evitaría el inicio desregulado de la replicación, y posteriormente, para evitar que algunos intermediarios generados por el estrés replicativo, que ocurren de manera normal durante la replicación, sean blanco de degradación por nucleasas cuya actividad se desregula debido a una actividad aumentada de las CDKs (Fig. 3). Será interesante determinar de qué manera se modula la actividad de Wee1 sobre CDK2 para que le permita niveles de actividad pertinentes que promuevan la replicación; ya que una actividad excesiva de Wee1 sobre CDK2 sería contraproducente para la replicación del DNA.

### La inhibición de Wee1 como estrategia para el tratamiento de cáncer

Una consecuencia de la desregulación del ciclo celular es la aparición de cáncer, donde la expresión de genes relacionados al ciclo celular es severamente afectada. Wee1 se ha considerado como su presor de tumores o como oncogén en distintos tipos de cáncer. En algunos tipos, la inestabilidad genó-



**Figura 3.** La actividad de Wee1 es necesaria en la transición G1/S. En la transición G1/S Wee1 mantiene inhibida a CDK1 para evitar que ésta fosforile a la endonucleasa de andamiaje SLX4, ya que su fosforilación promueve su asociación con la nucleasa MUS81/EME2, lo que en la fase S promovería la pulverización de los cromosomas. De manera similar, niveles bajos de actividad cinasa en CDK1 son promovidos por Wee1 para evitar la fosforilación de RRM2, ya que su fosforilación en la T33, durante la fase S, promovería el reconocimiento de RRM2 por la proteína F-box CycF para su ubiquitinación y posterior degradación; esto provocaría la disminución de la síntesis de desoxinucleótidos. Durante S, Wee1 también modula la actividad de CDK2 para evitar la degradación prematura de RRM2, ya que esta

CDK también fosforila a RRM2 en la T33. Adicionalmente, la regulación de Wee1 sobre CDK2 evita el inicio desregulado de la replicación, manteniendo una cantidad adecuada de orígenes de replicación cebados, ya que un exceso de orígenes de replicación consumiría rápidamente los componentes necesarios para la replicación y provocaría la disminución de la velocidad de replicación.

mica como resultado de la deficiencia del factor transcripcional p53, el cual en condiciones normales produce una respuesta a daño en el DNA y establece un “check point” que evita la duplicación del DNA dañado, provoca que Wee1 se comporte como un oncogén, estableciendo un “check point” previo a la entrada a mitosis que permite la reparación del DNA y en consecuencia la sobrevivencia de las células. En otros tipos de cáncer, la pérdida de Wee1 favorece la proliferación debido a que el punto de control G2/M no es activado permitiendo que las células entren a mitosis, incluso con DNA dañado (Revisado en 99, 100).

En diversas líneas de cáncer se ha observado la inhibición sostenida de los complejos CDK1/CycB, y una de las vías principales que media dicha inhibición involucra a Wee1, por lo que se ha sugerido que la actividad sostenida de Wee1 prolongaría la viabilidad de las células al mantener el arresto del ciclo celular en la transición G2/M; esto permitiría la acción de mecanismos de reparación, lo cual es contraproducente cuando el daño en el DNA es excesivo. Particularmente, la actividad de los complejos CDK1/CycB es necesaria para promover la apoptosis por daño en el DNA, por lo que una actividad excesiva de Wee1 también inhibiría la apoptosis (101, 102). En este sentido, se ha reportado que el factor transcripcional KLF2 (*Kruppel-like factor 2*), perteneciente a la familia de genes *Kruppel-like* que tienen una función importante en la proliferación celular y la diferenciación, reprime la expresión de Wee1, por lo que la expresión de KLF2 favorecería la inducción de apoptosis por daño en el DNA en la transición G2/M cuando la actividad de Wee1 es excesiva (103, 104). KLF4 y KLF6, otros miembros de la familia favorecen la expresión de p21 durante la transición G1/S cuando hay daño en el DNA, y en tipos de cáncer donde la expresión de KLF2, 4 y 6 es baja, la reexpresión de esos factores transcripcionales arresta el crecimiento y promueve el control del ciclo celular. La expresión de KLF2 en células tumorales es reducida por PCR2 (Complejo represivo polycomb 2), al promover la metilación de su región promotora, por lo que se ha sugerido la inhibición de PRC2 como terapia en tipos de cáncer donde la expresión de KLF2 es baja, lo cual evitaría la progresión de tumores mediante la reexpresión de KLF2 y la inhibición de la expresión de Wee1 (103-105).

Debido a la importante participación de Wee1 en respuesta a daño en el DNA, cuya actividad es necesaria para establecer un “check point” que permita la reparación del daño, la inhibición de Wee1 se ha utilizado para sensibilizar a células cancerosas con DNA dañado. Se ha observado que la sensibiliza-

ción se incrementa en células cancerosas deficientes de p53, puesto que en estas células el punto de control en G<sub>1</sub> no es capaz de detener el ciclo celular ante daño al DNA, y al evadir el punto de control G2/M, por la inhibición de Wee1, se activa la apoptosis por un daño irreparable en el DNA. Entonces la inhibición de Wee1 concomitantemente con agentes que dañan el DNA (químicos o físicos), en células que dependen únicamente de Wee1 para establecer un punto de control para la reparación del DNA, como aquellas deficientes en p53, se plantea como una estrategia que ayuda a la eliminación de células cancerosas (106).

Como se revisó en una sección anterior, la actividad de Wee1 es importante para regular el avance de la fase S, ya que su inhibición disminuye la velocidad de la replicación y provoca daño en el DNA (90, 91). De manera similar, la actividad de Chk1, una cinasa que participa en la vía ATR (Ataxia-Telangiectasia Relacionada) que detiene el ciclo celular en respuesta a estrés replicativo, es necesaria para regular el avance a través de la fase S en condiciones normales del ciclo celular, ya que su inhibición también promueve la disminución de la velocidad de la replicación y causa daño en el DNA (107-110). Cuando Wee1 y Chk1 se inhiben conjuntamente, se reduce aún más la velocidad de la replicación, pero no aumenta el daño en el DNA. Los estudios sugieren que Wee1 y Chk1 tienen una vía común para controlar la fase S, que sería la regulación de la actividad de CDK2, Wee1 fosforilando a CDK2 en la Y15; mientras que Chk1 promovería la degradación de CDC25A para estabilizar la fosforilación en la Y15. Por lo tanto, la regulación de CDK2 por ambas cinasas evitaría el inicio desregulado de la replicación y la actividad desregulada de nucleasas que incrementan su actividad por el aumento desregulado de la actividad de las CDKs (90, 91, 98, 111). Paralelamente, Chk1 regula negativamente a la cinasa Dbf4-Cdc7, la cual, en conjunto con CDK2, fosforila al complejo de prereplicación para permitir el cargado de la proteína CDC45, lo que favorece la activación de los orígenes de replicación. Cuando Wee1 es inhibido, Chk1 se activa y limita el cargado de CDC45, lo que limita el daño generado por la inhibición de Wee1; sin embargo, cuando Wee1 y Chk1 se inhiben conjuntamente se favorece el cargado de CDC45 de forma desregulada, causando un inicio masivo de orígenes de replicación no programados, lo que desencadena una catástrofe replicativa. Por lo tanto, la inhibición de ambas cinasas se plantea como una mejor estrategia para eliminar células cancerosas, en comparación a la inhibición individual de Wee1 o de Chk1 (109, 112-114).

Otra estrategia que ha sido eficaz en el tratamiento de células cancerosas ha sido la inhibición conjunta de Wee1 y Sirt1. Sirt1 pertenece a la familia de las sirtuinas, particularmente a la clase III de desacetilasas de histona, de las cuales algunos de sus miembros regulan la reparación por daño al DNA. Sirt1 desacetila proteínas de la vía de reparación por recombinación homóloga (HR) como NBS1 (*Nijmegen breakage síndrome 1*) y Rad51, que participan en el reclutamiento de proteínas reparativas y en el apareamiento de las hebras homólogas de DNA respectivamente. Cuando Sirt1 es inhibida, NBS1 y Rad51 acumulan acetilaciones y esto interfiere con el funcionamiento correcto de la vía de reparación. Entonces, cuando se administra el inhibidor de Wee1, que promueve la generación de daño en el DNA, concomitantemente con el inhibidor de Sirt1, se provoca un incremento de daño en el DNA debido a la inhibición de la reparación por HR, y esto incrementa el número de células que sufren apoptosis en comparación a cuando solo se inhibe a Wee1 (115-118).

Recientemente se ha reportado que el AZD1775, la molécula más ampliamente utilizada para abatir la actividad cinasa de Wee1, inhibe a otras cinasas con la misma eficacia con la que inhibe a Wee1, por lo que es probable que en los diversos experimentos en donde se ha utilizado el AZD1775, los resultados observados no se deban únicamente a la inhibición de Wee1 (119, 120). Debido a esto se han desarrollado nuevas estrategias para inhibir a Wee1; una de estas consiste en dirigir su degradación mediante una molécula bifuncional que se une tanto a Wee1 como a una ligasa E3 expresada normalmente en la célula, un sistema que se denomina PROTAC (*proteolysis targeting chimera*) (121, 122). Una de las ventajas del sistema es que la degradación de la proteína se da en concentraciones mucho menores a las requeridas para inhibir la actividad catalítica de las enzimas, lo cual limita la inhibición inespecífica de cinasas. Recientemente se reportaron moléculas que se unen a  $\beta$ -TrCP (123) y debido a que ésta promueve la ubiquitinación y degradación de Wee1 tanto en interfase como en mitosis, la ligasa se podría utilizar en el sistema PROTAC para potenciar la degradación de Wee1 como una estrategia contra el cáncer; aunque debido a que MIG6 antagoniza la asociación a  $\beta$ -TrCP en interfase, para una degradación exitosa a lo largo de todo el ciclo celular se deberá inhibir la expresión de MIG6. Además de  $\beta$ -TrCP también se podría dirigir la degradación de Wee1 mediante Tome-1, que hasta donde sabemos no existe algún mecanismo que antagonice su reconocimiento hacia Wee1, aunque primero será necesario encontrar moléculas que se asocien a Tome-1 para utilizar el sistema PROTAC.

Finalmente, se conoce que la proteína de unión a RNA HuR, sobreexpresada en líneas cancerosas, regula postranscripcionalmente al mRNA de Wee1 al unírsele y favorecer su exportación al citoplasma para ser traducido, lo que reestablece el punto de control G2/M, evitando así la catástrofe mitótica y favoreciendo la transformación celular, por lo tanto, la inhibición de HuR se ha propuesto como blanco terapéutico para promover la muerte de células cancerosas, mediante la desestabilización del mensajero de Wee1 (124).

En resumen, la estabilización de Wee1 en diversos tipos de cáncer promueve la supervivencia de las células, por lo que la inhibición de Wee1 parece ser una estrategia plausible para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, debido a que normalmente Wee1 regula la transición G1/S y la fase S, y evita el daño en el DNA controlando la actividad desregulada de diversas nucleasas, la inhibición de Wee1 conjuntamente con las vías encargadas de mantener la integridad del DNA parece una mejor estrategia para el tratamiento de células cancerosas, incluso para un rango más amplio de tipos de cáncer y no solo para aquellos en los que los niveles y/o actividad de Wee1 se encuentran desregulados.

## Conclusiones

En vertebrados, como se ha visto en esta revisión, la función de Wee1 es fundamental para la correcta progresión de todo el ciclo celular. En humanos, Wee1 fosforila a dos de las cuatro principales cinasas que controlan el ciclo celular, CDK1 y CDK2. CDK4 y CDK6, las que regulan principalmente la entrada al ciclo celular (G1), no son blanco de fosforilación por Wee1 y es muy probable que debido a esto, Wee1 no es tan importante en este punto como sí lo son miembros de la familia CIP/KIP e INK. Sin embargo, debido a la naturaleza continua del ciclo celular, en el que al término de la mitosis muchas proteínas deben ser degradadas, desfosforiladas e inactivadas, de manera más o menos simultánea al comienzo de la síntesis y activación de proteínas necesarias para la fase G1, la actividad de Wee1 es fundamental, como un mecanismo que funciona redundantemente junto a otros para asegurar la irreversibilidad de la mitosis. La regulación de CDK2 por Wee1 en la transición G1/S podría representar una paradoja, ya que CDK2 es necesaria para la replicación del DNA; sin embargo, existen mecanismos que mantienen un recambio de Wee1 en interfase, lo cual podría modular su actividad. Por otra parte, diversos estudios sugieren que al comienzo del ciclo celular se necesitan, en general, niveles menores de actividad cinasa, mientras que para la ejecución de la mitosis se re-



quieren niveles mucho mayores (125). Por lo tanto, en la fase S, los procesos necesarios para su ejecución se podrían estar realizando a pesar de la inhibición de CDK2 por Wee1.

Por otra parte, la inhibición de Wee1 en conjunto con el daño al DNA o la inhibición de otros reguladores del ciclo celular parecen acciones promete-

doras en el tratamiento de cáncer; sin embargo, como en otras estrategias que se están empleando contra el cáncer, habrá que dirigir los esfuerzos en la obtención de terapias que afecten únicamente a los tipos celulares afectados y no a todas las células en general.



## Referencias

1. Morgan DO. The cell cycle: Principles of control. Londres, Inglaterra. New Science Press; 2007.
2. Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, editores. Biochemistry and molecular biology of plants. 2a ed. Hoboken, NJ, Estados Unidos de América: Wiley-Blackwell; 2015.
3. Nolen B, Taylor S, Ghosh G. Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. Mol Cell. 2004;15(5):661–75.
4. Poon RY, Yamashita K, Adamczewski JP, Hunt T, Shuttleworth J. The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdc2 and p34cdc2. EMBO J. 1993;12(8):3123–32.
5. Fisher RP, Morgan DO. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. Cell. 1994;78(4):713–24.
6. Ettl T, Schulz D, Bauer RJ. The renaissance of cyclin dependent kinase inhibitors. Cancers (Basel). 2022;14(2):293.
7. Honda R, Ohba Y, Yasuda H. The cell cycle regulator, human p50weel, is a tyrosine kinase and not a serine/tyrosine kinase. Biochem Biophys Res Commun. 1992;186(3):1333–8.
8. Parker LL, Atherton-Fessler S, Piwnicka-Worms H. P107wee1 is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(7):2917–21.
9. Watanabe N, Broome M, Hunter T. Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. EMBO J. 1995;14(9):1878–91.
10. Liu F, Stanton JJ, Wu Z, Piwnicka-Worms H. The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. Mol Cell Biol. 1997;17(2):571–83.
11. Mueller PR, Coleman TR, Kumagai A, Dunphy WG. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. Science. 1995;270(5233):86–90.
12. Nakanishi M, Ando H, Watanabe N, Kitamura K, Ito K, Okayama H, et al. Identification and characterization of human Wee1B, a new member of the Wee1 family of Cdk-inhibitory kinases: Identification and characterization of human Wee1B. Genes Cells. 2000;5(10):839–47.
13. Han SJ, Chen R, Paronetto MP, Conti M. Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. Curr Biol. 2005;15(18):1670–6.
14. Oh JS, Han SJ, Conti M. Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. J Cell Biol. 2010;188(2):199–207.
15. Adhikari D, Busayavalasa K, Zhang J, Hu M, Risal S, Bayazit MB, et al. Inhibitory phosphorylation of Cdk1 mediates prolonged prophase I arrest in female germ cells and is essential for female reproductive lifespan. Cell Res. 2016;26(11):1212–25.
16. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. The Cell-Division Cycle. In: Molecular biology of the cell. 5a ed. Londres, Inglaterra: Garland Science; 2015. p.609-649.
17. Oh JS, Susor A, Conti M. Protein tyrosine kinase Wee1B is essential for metaphase II exit in mouse oocytes. Science. 2011;332(6028):462–5.
18. Squire CJ, Dickson JM, Ivanovic I, Baker EN. Structure and inhibition of the human cell cycle checkpoint kinase, Wee1A kinase: an atypical



tyrosine kinase with a key role in CDK1 regulation. *Structure*. 2005;13(4):541–50.

19. Welburn JPI, Tucker JA, Johnson T, Lindert L, Morgan M, Willis A, et al. How tyrosine 15 phosphorylation inhibits the activity of cyclin-dependent kinase 2-cyclin A. *J Biol Chem*. 2007;282(5):3173–81.

20. Nurse P. Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*. 1975;256(5518):547–51.

21. Thuriaux P, Nurse P, Carter B. Mutants altered in the control co-ordinating cell division with cell growth in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet*. 1978;161(2):215–20.

22. Nurse P. Wee beasts. *Nature*. 2004;432(7017):557.

23. Gould KL, Moreno S, Tonks NK, Nurse P. Complementation of the mitotic activator, p80cdc25, by a human protein-tyrosine phosphatase. *Science*. 1990;250(4987):1573–6.

24. Lee MS, Enoch T, Piwnica-Worms H. Mik1+ encodes a tyrosine kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *J Biol Chem*. 1994;269(48):30530–7.

25. Lundgren K, Walworth N, Booher R, Dembski M, Kirschner M, Beach D. Mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell*. 1991;64(6):1111–22.

26. Nurse P, Bissett Y. Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature*. 1981;292(5823):558–60.

27. Lowndes NF, Johnson AL, Johnston LH. Coordination of expression of DNA synthesis genes in budding yeast by a cell-cycle regulated trans factor. *Nature*. 1991;350(6315):247–50.

28. Lowndes NF, McNerny CJ, Johnson AL, Fantes PA, Johnston LH. Control of DNA synthesis genes in fission yeast by the cell-cycle gene cdc10+. *Nature*. 1992;355(6359):449–53.

29. Igarashi M, Nagata A, Jinno S, Suto K, Okayama H. Wee1(+)-like gene in human cells. *Nature*. 1991;353(6339):80–3.

30. Campbell SD, Sprenger F, Edgar BA, O'Farrell PH. Drosophila Wee1 kinase rescues fission yeast from mitotic catastrophe and phosphorylates Drosophila Cdc2 in vitro. *Mol Biol Cell*. 1995;6(10):1333–47.

31. Mueller PR, Coleman TR, Dunphy WG. Cell cycle regulation of a Xenopus Wee1-like kinase. *Mol Biol Cell*. 1995;6(1):119–34.

32. Krek W, Nigg EA. Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates. *EMBO J*. 1991;10(11):3331–41.

33. McGowan CH, Russell P. Cell cycle regulation of human WEE1. *EMBO J*. 1995;14(10):2166–7.

34. Parker LL, Sylvestre PJ, Byrnes MJ 3rd, Liu F, Piwnica-Worms H. Identification of a 95-kDa WEE1-like tyrosine kinase in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(21):9638–42.

35. Gabrielli BG, De Souza CP, Tonks ID, Clark JM, Hayward NK, Ellem KA. Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. *J Cell Sci*. 1996;109 ( Pt 5)(5):1081–93.

36. Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnica-Worms H, et al. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*. 1997;277(5331):1497–501.

37. Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnica-Worms H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*. 1997;277(5331):1501–5.

38. Lammer C, Wagerer S, Saffrich R, Mertens D, Ansorge W, Hoffmann I. The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J Cell Sci*. 1998;111 ( Pt 16)(16):2445–53.

39. Blomberg I, Hoffmann I. Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol Cell Biol*. 1999;19(9):6183–94.

40. Boutros R, Dozier C, Ducommun B. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18(2):185–91.

41. Honda R, Tanaka H, Ohba Y, Yasuda H. Mouse p87wee1 kinase is regulated by M-phase specific phosphorylation. *Chromosome Res*. 1995;3(5):300–8.

42. Michael WM, Newport J. Coupling of mitosis to the completion of S phase through Cdc34-mediated degradation of Wee1. *Science*. 1998;282(5395):1886–9.

43. Ayad NG, Rankin S, Murakami M, Jebanathirajah J, Gygi S, Kirschner MW. Tome-1, a trigger of mitotic entry, is degraded during G1 via the APC. *Cell*. 2003;113(1):101–13.

44. Smith A, Simanski S, Fallahi M, Ayad NG. Redundant ubiquitin ligase activities regulate wee1 degradation and mitotic entry. *Cell Cycle*. 2007;6(22):2795–9.
45. Li M, Zhang P. The function of APC/CCdh1 in cell cycle and beyond. *Cell Div*. 2009;4(1):2.
46. Watanabe N, Arai H, Iwasaki J-I, Shiina M, Ogata K, Hunter T, et al. Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(33):11663–8.
47. Penas C, Ramachandran V, Simanski S, Lee C, Madoux F, Rahaim RJ, et al. Casein kinase 1 $\delta$ -dependent Wee1 protein degradation. *J Biol Chem*. 2014;289(27):18893–903.
48. Watanabe N, Arai H, Nishihara Y, Taniguchi M, Watanabe N, Hunter T, et al. M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCF $\beta$ -TrCP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(13):4419–24.
49. Lowery DM, Lim D, Yaffe MB. Structure and function of Polo-like kinases. *Oncogene*. 2005;24(2):248–59.
50. Owens L, Simanski S, Squire C, Smith A, Cartzendafner J, Cavett V, et al. Activation domain-dependent degradation of somatic Wee1 kinase. *J Biol Chem*. 2010;285(9):6761–9.
51. Li C, Andrade M, Dunbrack R, Enders GH. A bifunctional regulatory element in human somatic Wee1 mediates cyclin A/Cdk2 binding and Crm1-dependent nuclear export. *Mol Cell Biol*. 2010;30(1):116–30.
52. Schulman BA, Lindstrom DL, Harlow E. Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(18):10453–8.
53. Xu D, Li C. Gene 33/Mig6/ERRFI1, an adapter protein with complex functions in cell biology and human diseases. *Cells*. 2021;10(7):1574.
54. Sasaki M, Terabayashi T, Weiss SM, Ferby I. The tumor suppressor MIG6 controls mitotic progression and the G2/M DNA damage checkpoint by stabilizing the WEE1 kinase. *Cell Rep*. 2018;24(5):1278–89.
55. Touati SA, Hofbauer L, Jones AW, Snijders AP, Kelly G, Uhlmann F. Cdc14 and PP2A phosphatases cooperate to shape phosphoproteome dynamics during mitotic exit. *Cell Rep*. 2019;29(7):2105–2119.e4.
56. Ovejero S, Ayala P, Bueno A, Sacristán MP. Human Cdc14A regulates Wee1 stability by counteracting CDK-mediated phosphorylation. *Mol Biol Cell*. 2012;23(23):4515–25.
57. Vázquez-Novelle MD, Mailand N, Ovejero S, Bueno A, Sacristán MP. Human Cdc14A phosphatase modulates the G2/M transition through Cdc25A and Cdc25B. *J Biol Chem*. 2010;285(52):40544–53.
58. Okamoto K, Sagata N. Mechanism for inactivation of the mitotic inhibitory kinase Wee1 at M phase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(10):3753–8.
59. Kim SY, Song EJ, Lee K-J, Ferrell JE Jr. Multisite M-phase phosphorylation of Xenopus Wee1A. *Mol Cell Biol*. 2005;25(23):10580–90.
60. Kim SY, Ferrell JE Jr. Substrate competition as a source of ultrasensitivity in the inactivation of Wee1. *Cell*. 2007;128(6):1133–45.
61. Harvey SL, Charlet A, Haas W, Gygi SP, Kellogg DR. Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1. *Cell*. 2005;122(3):407–20.
62. Deibler RW, Kirschner MW. Quantitative reconstitution of mitotic CDK1 activation in somatic cell extracts. *Mol Cell*. 2010;37(6):753–67.
63. Gong D, Ferrell JE Jr. The roles of cyclin A2, B1, and B2 in early and late mitotic events. *Mol Biol Cell*. 2010;21(18):3149–61.
64. Fung TK, Ma HT, Poon RYC. Specialized roles of the two mitotic cyclins in somatic cells: Cyclin A as an activator of M phase-promoting factor. *Mol Biol Cell*. 2007;18(5):1861–73.
65. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J*. 1992;11(3):961–71.
66. Guadagno TM, Newport JW. Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of Cdc2-cyclin B kinase activity. *Cell*. 1996;84(1):73–82.
67. Hu B, Mitra J, van den Heuvel S, Enders GH. S and G2 phase roles for Cdk2 revealed by inducible expression of a dominant-negative mutant in human cells. *Mol Cell Biol*. 2001;21(8):2755–66.
68. Devault A, Fesquet D, Cavadore JC, Garrigues AM, Labbé JC, Lorca T, et al. Cyclin A potentiates maturation-promoting factor activation in the early Xenopus embryo via inhibition of the tyrosine kinase that phosphorylates cdc2. *J Cell Biol*. 1992;118(5):1109–20.

69. Hégarat N, Crnec A, Suarez Peredo Rodriguez MF, Echegaray Iturra F, Gu Y, Busby O, et al. Cyclin A triggers Mitosis either via the Greatwall kinase pathway or Cyclin B. *EMBO J*. 2020;39(11):e104419.
70. Gu Y, Rosenblatt J, Morgan DO. Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *EMBO J*. 1992;11(11):3995–4005.
71. Gabrielli BG, Clark JM, McCormack AK, Ellem KA. Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of Cdc25 regulates activity toward cyclin B1/Cdc2 but not cyclin A/Cdk2. *J Biol Chem*. 1997;272(45):28607–14.
72. Goldstone S, Pavey S, Forrest A, Sinnamon J, Gabrielli B. Cdc25-dependent activation of cyclin A/cdk2 is blocked in G2 phase arrested cells independently of ATM/ATR. *Oncogene*. 2001;20(8):921–32.
73. Baldin V, Ducommun B. Subcellular localisation of human weel kinase is regulated during the cell cycle. *J Cell Sci*. 1995;108 (Pt 6)(6):2425–32.
74. Gavet O, Pines J. Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J Cell Biol*. 2010;189(2):247–59.
75. Boutros R, Ducommun B. Asymmetric localization of the CDC25B phosphatase to the mother centrosome during interphase. *Cell Cycle*. 2008;7(3):401–6.
76. Grallert A, Patel A, Tallada VA, Chan KY, Bagley S, Krapp A, et al. Centrosomal MPF triggers the mitotic and morphogenetic switches of fission yeast. *Nat Cell Biol*. 2013;15(1):88–95.
77. Basu S, Roberts EL, Jones AW, Swaffer MP, Snijders AP, Nurse P. The hydrophobic patch directs cyclin B to centrosomes to promote global CDK phosphorylation at mitosis. *Curr Biol*. 2020;30(5):883–892.e4.
78. Lin M, Xie SS, Chan KY. An updated view on the centrosome as a cell cycle regulator. *Cell Div*. 2022;17(1):1.
79. D'Angiolella V, Palazzo L, Santarpia C, Costanzo V, Grieco D. Role for non-proteolytic control of M-phase-promoting factor activity at M-phase exit. *PLoS One*. 2007;2(2):e247.
80. Rudner AD, Murray AW. Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J Cell Biol*. 2000;149(7):1377–90.
81. Yudkovsky Y, Shteinberg M, Listovsky T, Brandeis M, Hershko A. Phosphorylation of Cdc20/fizzy negatively regulates the mammalian cyclosome/APC in the mitotic checkpoint. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;271(2):299–304.
82. D'Angiolella V, Mari C, Nocera D, Rametti L, Grieco D. The spindle checkpoint requires cyclin-dependent kinase activity. *Genes Dev*. 2003;17(20):2520–5.
83. Visconti R, Palazzo L, Della Monica R, Grieco D. Fcp1-dependent dephosphorylation is required for M-phase-promoting factor inactivation at mitosis exit. *Nat Commun*. 2012;3(1):894.
84. Chow JPH, Poon RYC, Ma HT. Inhibitory phosphorylation of cyclin-dependent kinase 1 as a compensatory mechanism for mitosis exit. *Mol Cell Biol*. 2011;31(7):1478–91.
85. Potapova TA, Daum JR, Byrd KS, Gorbysky GJ. Fine tuning the cell cycle: activation of the Cdk1 inhibitory phosphorylation pathway during mitotic exit. *Mol Biol Cell*. 2009;20(6):1737–48.
86. Gabrielli BG, Lee MS, Walker DH, Piwnicka-Worms H, Maller JL. Cdc25 regulates the phosphorylation and activity of the *Xenopus* cdk2 protein kinase complex. *J Biol Chem*. 1992;267(25):18040–6.
87. Sebastian B, Kakizuka A, Hunter T. Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(8):3521–4.
88. Zhao H, Chen X, Gurian-West M, Roberts JM. Loss of cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) inhibitory phosphorylation in a CDK2AF knock-in mouse causes misregulation of DNA replication and centrosome duplication. *Mol Cell Biol*. 2012;32(8):1421–32.
89. Hughes BT, Sidorova J, Swanger J, Monnat RJ Jr, Clurman BE. Essential role for Cdk2 inhibitory phosphorylation during replication stress revealed by a human Cdk2 knockin mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(22):8954–9.
90. Domínguez-Kelly R, Martín Y, Koundrioukoff S, Tanenbaum ME, Smits VAJ, Medema RH, et al. Wee1 controls genomic stability during replication by regulating the Mus81-Eme1 endonuclease. *J Cell Biol*. 2011;194(4):567–79.
91. Beck H, Nähse V, Larsen MSY, Groth P, Clancy T, Lees M, et al. Regulators of cyclin-dependent kinases are crucial for maintaining genome integrity in S phase. *J Cell Biol*. 2010;188(5):629–38.



- 92.** Beck H, Nähse-Kumpf V, Larsen MSY, O'Hanlon KA, Patzke S, Holmberg C, et al. Cyclin-dependent kinase suppression by WEE1 kinase protects the genome through control of replication initiation and nucleotide consumption. *Mol Cell Biol.* 2012;32(20):4226–36.
- 93.** D'Angiolella V, Donato V, Forrester FM, Jeong Y-T, Pellacani C, Kudo Y, et al. Cyclin F-mediated degradation of ribonucleotide reductase M2 controls genome integrity and DNA repair. *Cell.* 2012;149(5):1023–34.
- 94.** Pfister SX, Markkanen E, Jiang Y, Sarkar S, Woodcock M, Orlando G, et al. Inhibiting WEE1 selectively kills histone H3K36me3-deficient cancers by dNTP starvation. *Cancer Cell.* 2015;28(5):557–68.
- 95.** Wroble BN, Finkielstein CV, Sible JC. Wee1 kinase alters cyclin E/Cdk2 and promotes apoptosis during the early embryonic development of *Xenopus laevis*. *BMC Dev Biol.* 2007;7(1):119.
- 96.** Naim V, Wilhelm T, Debatisse M, Rosselli F. ERCC1 and MUS81-EME1 promote sister chromatid separation by processing late replication intermediates at common fragile sites during mitosis. *Nat Cell Biol.* 2013;15(8):1008–15.
- 97.** Minocherhomji S, Ying S, Bjerregaard VA, Bursomanno S, Aleliunaite A, Wu W, et al. Replication stress activates DNA repair synthesis in mitosis. *Nature.* 2015;528(7581):286–90.
- 98.** Duda H, Arter M, Gloggnitzer J, Teloni F, Wild P, Blanco MG, et al. A mechanism for controlled breakage of under-replicated chromosomes during mitosis. *Dev Cell.* 2016;39(6):740–55.
- 99.** De Witt Hamer PC, Mir SE, Noske D, Van Noorden CJF, Würdinger T. WEE1 kinase targeting combined with DNA-damaging cancer therapy catalyzes mitotic catastrophe. *Clin Cancer Res.* 2011;17(13):4200–7.
- 100.** Abuetabh Y, Wu HH, Chai C, Al Yousef H, Persad S, Sergi CM, et al. DNA damage response revisited: the p53 family and its regulators provide endless cancer therapy opportunities. *Exp Mol Med.* 2022;54(10):1658–69.
- 101.** Mir SE, De Witt Hamer PC, Krawczyk PM, Balaj L, Claes A, Niers JM, et al. In silico analysis of kinase expression identifies WEE1 as a gatekeeper against mitotic catastrophe in glioblastoma. *Cancer Cell.* 2010;18(3):244–57.
- 102.** Kim H-Y, Cho Y, Kang H, Yim Y-S, Kim S-J, Song J, et al. Targeting the WEE1 kinase as a molecular targeted therapy for gastric cancer. *Oncotarget.* 2016;7(31):49902–16.
- 103.** Bieker JJ. Krüppel-like factors: Three fingers in many pies. *J Biol Chem.* 2001;276(37):34355–8.
- 104.** Wang F, Zhu Y, Huang Y, McAvoy S, Johnson WB, Cheung TH, et al. Transcriptional repression of WEE1 by Kruppel-like factor 2 is involved in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene.* 2005;24(24):3875–85.
- 105.** Taghehchian N, Maharati A, Akhlaghipour I, Zangouei AS, Moghbeli M. PRC2 mediated KLF2 down regulation: a therapeutic and diagnostic axis during tumor progression. *Cancer Cell Int.* 2023;23(1).
- 106.** Do K, Doroshow JH, Kummar S. Wee1 kinase as a target for cancer therapy. *Cell Cycle.* 2013;12(19):3159–64.
- 107.** Syljuåsen RG, Sørensen CS, Hansen LT, Fugger K, Lundin C, Johansson F, et al. Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol.* 2005;25(9):3553–62.
- 108.** Petermann E, Maya-Mendoza A, Zachos G, Gillespie DAF, Jackson DA, Caldecott KW. Chk1 requirement for high global rates of replication fork progression during normal vertebrate S phase. *Mol Cell Biol.* 2006;26(8):3319–26.
- 109.** Petermann E, Woodcock M, Helleday T. Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(37):16090–5.
- 110.** Maya-Mendoza A, Petermann E, Gillespie DAF, Caldecott KW, Jackson DA. Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. *EMBO J.* 2007;26(11):2719–31.
- 111.** Elbæk CR, Petrosius V, Benada J, Erichsen L, Damgaard RB, Sørensen CS. WEE1 kinase protects the stability of stalled DNA replication forks by limiting CDK2 activity. *Cell Rep.* 2022;38(3):110261.
- 112.** Moiseeva T, Hood B, Schamus S, O'Connor MJ, Conrads TP, Bakkenist CJ. ATR kinase inhibition induces unscheduled origin firing through a Cdc7-dependent association between GINS and And-1. *Nat Commun.* 2017;8(1):1392.
- 113.** Zou L, Stillman B. Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol Cell Biol.* 2000;20(9):3086–96.



- 114.** Hauge S, Naucke C, Hasvold G, Joel M, Rødland GE, Juzenas P, et al. Combined inhibition of Wee1 and Chk1 gives synergistic DNA damage in S-phase due to distinct regulation of CDK activity and CDC45 loading. *Oncotarget*. 2017;8(7):10966–79.
- 115.** Zhang Y, Zhou J, Lim CU. The role of NBS1 in DNA double strand break repair, telomere stability, and cell cycle checkpoint control. *Cell Res*. 2006;16(1):45–54.
- 116.** McCord RA, Michishita E, Hong T, Berber E, Boxer LD, Kusumoto R, et al. SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging (Albany NY)*. 2009;1(1):109–21.
- 117.** Bonilla B, Hengel SR, Grundy MK, Bernstein KA. RAD51 gene family structure and function. *Annu Rev Genet*. 2020;54(1):25–46.
- 118.** Chen G, Zhang B, Xu H, Sun Y, Shi Y, Luo Y, et al. Suppression of Sirt1 sensitizes lung cancer cells to WEE1 inhibitor MK-1775-induced DNA damage and apoptosis. *Oncogene*. 2017;36(50):6863–72.
- 119.** Zhu J-Y, Cuellar RA, Berndt N, Lee HE, Olesen SH, Martin MP, et al. Structural basis of Wee kinases functionality and inactivation by diverse small molecule inhibitors. *J Med Chem*. 2017;60(18):7863–75.
- 120.** Wright G, Golubeva V, Remsing Rix LL, Berndt N, Luo Y, Ward GA, et al. Dual targeting of WEE1 and PLK1 by AZD1775 elicits single agent cellular anticancer activity. *ACS Chem Biol*. 2017;12(7):1883–92.
- 121.** Bondeson DP, Mares A, Smith IED, Ko E, Campos S, Miah AH, et al. Catalytic in vivo protein knockdown by small-molecule PROTACs. *Nat Chem Biol*. 2015;11(8):611–7.
- 122.** Aublette MC, Harrison TA, Thorpe EJ, Gadd MS. Selective Wee1 degradation by PROTAC degraders recruiting VHL and CRBN E3 ubiquitin ligases. *Bioorg Med Chem Lett*. 2022;64(128636):128636.
- 123.** Liu X, Sanada E, Li J, Li X, Osada H, Watanabe N. Isolation and characterization of  $\beta$ -transducin repeat-containing protein ligands screened using a high-throughput screening system. *Oncol Res*. 2023;31(5):645–54.
- 124.** Lal S, Burkhart RA, Beeharry N, Bhattacharjee V, Londin ER, Cozzitorto JA, et al. HuR posttranscriptionally regulates WEE1: Implications for the DNA damage response in pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 2014;74(4):1128–40.
- 125.** Fisher D, Krasinska L. Explaining redundancy in CDK-mediated control of the cell cycle: Unifying the continuum and quantitative models. *Cells*. 2022;11(13):2019.