

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

ÚLOHA CHECKPOINT KINÁZY 1 BĚHEM ZRÁNÍ MYŠÍCH OOCYTŮ
(The involvement of checkpoint kinase 1 in maturation of mouse oocyte)

PAVEL MATUŠKA

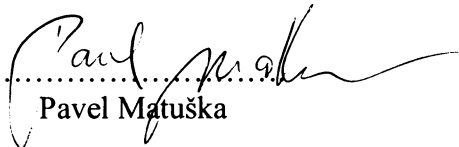
Praha, září 2008

Školitel: Prof. MVDr. Jan Motlík, DrSC.

Tato diplomová práce byla vypracována na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR v Liběchově.

Prohlašuji, že diplomovou práci jsem vypracoval samostatně, pouze s použitím citovaných pramenů, které uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze dne 1.září 2008


Pavel Matuška

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Prof. MVDr. Janu Motlíkovi, DrSc. za odbornou i finanční podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout, i za cenné připomínky a konzultace, jež směřovaly celý její průběh.

Chtěl bych vyjádřit dík také svým spolupracovníkům Mgr. Petru Šolcovi za četné diskuze nad postupem práce a pomoc s výrobou dsRNA a mRNA, Ing. Adéle Šaškové za obětavou pomoc při mikroinjkcích a MVDr. Vladimíru Baranovi, CSc. za pomoc při imunocytochemii.

Zvláštní poděkování patří mé manželce, která mě vždy povzbuzovala a byla mi oporou. Měla se mnou trpělivost i během mých častých nočních pobytů v laboratoři.

Svým rodičům velmi vděčím za podporu po celou dobu studia na univerzitě.

ABSTRACT

The checkpoint kinase 1 (CHK1) is an established effector molecule of ATR-/ATM-dependent signaling pathway, activated in response to DNA damage. However, CHK1 now appears to play also important roles during unperturbed cell cycle. In interphase, CHK1 localizes to centrosomes and negatively regulates entry into mitosis by preventing premature activation of CDK1/cyclin B complex. During S phase, CHK1 is responsible for maintaining the physiological turnover of CDC25A and also functions to coordinate mitotic events through regulation of CDC25B. Moreover CHK1 is required for the spindle checkpoint which protects against spontaneous chromosome mis-segregation. Chk $-/-$ mice are embryonic lethal and therefore a role for CHK1 in meiosis is unknown. This work for the first time reports that CHK1 is involved in meiotic maturation of mouse oocytes. The amount of CHK1 protein increases from GV to MII phase but its phosphorylation on Ser317 occurs mainly between phases MI and MII. Inhibition of CHK1 kinase activity by SB218078 inhibitor results in delay of GVBD and compromises CDK1 activity. The spindle migration and cortical membrane differentiation is disrupted due to CHK1 inhibition and cytokinesis emerges defectively. In addition spindle assembly checkpoint induced by taxol was partially overcome in SB218078-treated oocytes. CHK1 depletion by RNA interference leads to disturbances in chromosome congression, alignment and segregation. Finally, over-expression of GFP-CHK1 blocks meiotic maturation in GV-stage, CHK1 is localized to the nucleus. These findings indicate that CHK1 has a crucial function in mammalian oocytes and will be the subject of future investigations.

OBSAH

ABSTRACT	4
OBSAH	5
ÚVOD	6
LITERÁRNÍ PŘEHLED	
Kontrolní body buněčného cyklu	7
Charakteristika checkpoint kinázy 1	8
Poškození DNA a aktivace checkpoint kináz	11
Fyziologické role CHK1	15
Návrat z kontrolního bodu	22
CHK1 v meióze	24
MATERIÁL A METODY	
Izolace, kultivace a mikroinjekce oocytů	27
In vitro výroba dsRNA a mRNA	27
Western blotting	28
Imunocytochemie	29
Histon H1/CDK1 kinázová assay	30
Analýza a zpracování dat	30
VÝSLEDKY	
Exprese a fosforylace CHK1	31
Chemická inhibice CHK1	32
Downregulace CHK1 pomocí RNAi	40
Over-exprese CHK1	42
DISKUZE	44
ZÁVĚR	50
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	51
SEZNAM LITERATURY	54

ÚVOD

Checkpoint kináza 1 (CHK1) byla dlouho považována pouze za součást signální dráhy aktivované při odpovědi buňky na poškození DNA. V současné době však byla popsána také její fyziologická role v neovlivněném buněčném cyklu somatických buněk. Na základě těchto zjištění vznikla otázka, zda je CHK1 aktivní také v meiotickém zrání myších oocytů.

Tato diplomová práce si klade za úkol charakterizovat případnou funkci CHK1 kinázy v myších oocytech. Za tímto účelem byly stanoveny následující cíle:

- stanovit expresi a fosforylaci CHK1 v průběhu meiotického zrání
- zjistit, zda se CHK1 účastní znovuzahájení zrání
- pomocí CHK1 inhibitoru SB218078 popsat funkci CHK1 v dalších fázích zrání
- ověřit možnou úlohu CHK1 v spindle assembly checkpoint (SAC)
- pomocí funkčních studií RNA interference a over-exprese CHK1 mRNA popsat účinek deplece CHK1 na meiotické zrání a lokalizaci CHK1 v oocytu

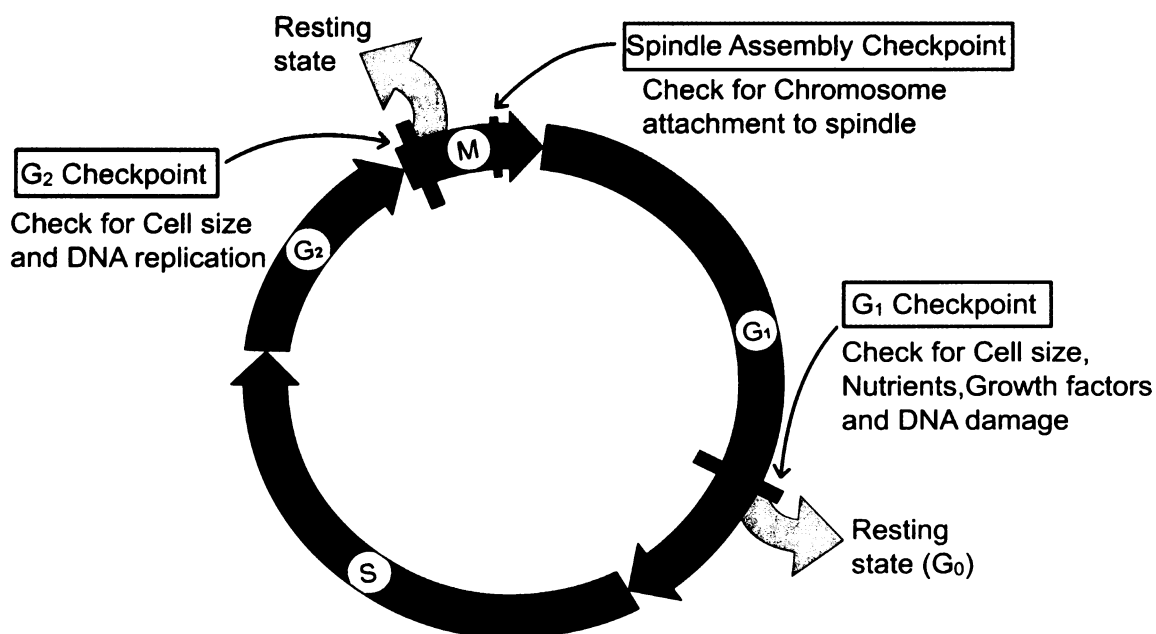
Vysvětlení těchto doposud neobjasněných otázek pomůže lépe pochopit funkci CHK1 v regulaci buněčného cyklu a přiblíží mechanismy řízení meiotického zrání u savců na molekulární úrovni.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Kontrolní body buněčného cyklu

Průběh buněčného cyklu eukaryotické buňky závisí na integritě genomu, to znamená, že buňka zastaví růst i dělení pokud dojde k poškození DNA nebo dokud není kompletně dokončena replikace celé DNA molekuly. Na precizním zkopírování genetické informace stejně jako na přesné segregaci chromozomů do dceřiných buněk totiž závisí přežití celého organismu. Za účelem dosažení takovéto přesnosti vyvinuly buňky regulační mechanismy monitorující přechody mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu, schopné dočasného zastavení cyklu v případě, že je potřeba dát buňce čas na opravu DNA či jiných defektů. Tyto mechanismy byly nazvány kontrolními body (*checkpoints*). Jedná se o fylogeneticky velmi zachované signální dráhy, jejichž původně definovanou funkcí bylo pouze pozastavení buněčného cyklu v případě poškození DNA. Ukázalo se však, že tyto signální dráhy hrají mnohem komplexnější roli – účastní se také aktivace DNA opravných mechanismů, udržování délky telomér, aktivace transkripčních programů a pravděpodobně mohou indukovat i apoptózu (Zhou & Elledge 2000).

V buněčném cyklu rozlišujeme několik kontrolních bodů (Obr.1). G_1 – kontrolní bod se nachází na konci G_1 – fáze. V tomto místě se buňka rozhoduje, zda má dostatečnou velikost, množství živin a růstových faktorů, aby mohla vstoupit do cyklu.



Obrázek 1: Schéma kontrolních bodů v buněčném cyklu. Převzato z [1].

Pokud tyto podmínky nejsou splněny, buňka vystupuje z cyklu do G_0 – fáze. V této fázi setrvávají také nedělící se diferencované buňky. O G_1 – kontrolním bodě se mluví také jako o tzv. restričním místě. Když buňka projde tímto místem, je předurčena k dokončení celého cyklu, i kdyby v jeho průběhu nastal nedostatek růstových faktorů.

G_2/M – kontrolní bod se nachází na přechodu mezi G_2 – fází a mitózou (M – fáze). Pro vstup do mitózy a dělení buňky je kritické, aby byla kompletně dokončena replikace DNA, a aby byla DNA neporušená.

Spindle Assembly Checkpoint (SAC) je kontrolní bod, který brání vstupu do anafáze, dokud nedojde k připojení všech kinetochor jednotlivých chromozomů na kinetochorové mikrotubuly dělicího vřetenka. Tímto způsobem se buňka chrání před vznikem možných aneuploidií. SAC funguje v meióze stejně jako v mitóze, pouze s tím rozdílem, že během prvního meiotického dělení tvoří kinetochory sesterských chromatid v každém homologním chromozomu monopolární strukturu orientovanou k jednomu pólu dělicího vřetenka. Pnutí způsobené tahem mikrotubulů tak vzniká nikoliv mezi chromatidami, ale mezi homologními chromozomy, které jsou navzájem propojeny chiasmaty ve struktuře nazývané bivalent.

Další kontrolní body se nachází v S – fázi (nezobrazeno), která je pro buňku asi nejzranitelnějším obdobím, protože replikace DNA je velmi náročný proces, při němž může spontánně dojít k mnoha druhům chyb a poškození DNA. Pro udržení stability genomu mají tyto kontrolní body patrně ještě většího významu než tři předchozí. Rozlišujeme replikační kontrolní bod (*replication checkpoint*) aktivovaný v případě zastavení replikační vidlice, ať už z důvodu kolize s poškozenou DNA nebo nedostatku deoxyribonukleotidů, S-M kontrolní bod bránící zahájení mitózy v případě nedokončené replikace a intra-S- fází kontrolní bod (*intra-S- phase checkpoint*) aktivovaný při detekci dvojřetězcových zlomů kdekoli na DNA (Bartek et al 2004).

Kontrolní body buněčného cyklu je třeba chápat jako dynamické procesy. Nejspíše nejde o statické fáze, kterými buňka v určité chvíli prochází, ale o signální kaskády citlivé k různým druhům poškození genetické informace, které jsou připraveny zabrzdit buňku kdykoliv je ohrožena integrita genomu.

Charakteristika checkpoint kinázy 1

Signální dráhy jednotlivých kontrolních bodů jsou citlivé k poškození DNA a zároveň jsou schopné přenosu signálu o poškození dále do buňky k efektorovým proteinům. Mezi klíčové přenašeče signálu patří *checkpoint kinase 1* (CHK1) a *checkpoint kinase 2* (CHK2). Tyto kinázy jsou nezbytnou součástí drah vedoucích k aktivaci kontrolních bodů (Bartek & Lukas 2003).

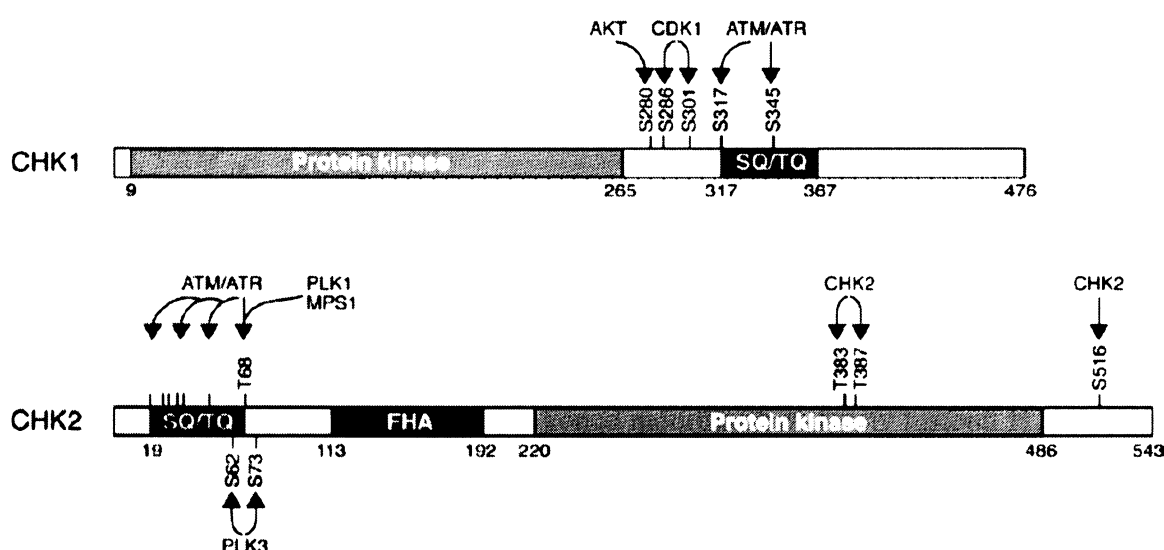
Checkpoint kináza 1 byla poprvé identifikována u kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* krátce po objevu existence kontrolních bodů. Různé kvasinkové mutanty byly selektovány na základě jejich senzitivity k poškození DNA způsobené radiací. Tyto buňky nebyly schopné zastavit buněčný cyklus v odpověď na poruchy v DNA nebo nedokončenou replikaci. Z těchto buněk byly izolovány komponenty schopné interakce s p34cdc2 (kvasinkovou CDK1), z nichž byl identifikován nový homolog kvasinkové protein kinázy – ten byl nazván checkpoint kináza 1 (Walworth et al 1993). Pomocí CHK1 bylo možno částečně dosáhnout rescue efektu, tzn. mutanty senzitivní k radiaci byly opět schopny zastavit buněčný cyklus v kontrolním bodě. V lidských fibroblastech bylo ukázáno, že CHK1 lokalizuje v jádře a její exprese na úrovni proteinu i mRNA je závislá na fázi buněčného cyklu, konkrétně na S a G₂ – fázi (Kaneko et al 1999).

Kromě odpovědi buňky na poškození DNA a aktivace kontrolních bodů (probíráno ve třetí kapitole), se CHK1 účastní také dalších buněčných dějů (Enders 2008). Knock-out modely ukázaly, že je nezbytná pro savčí embryonální vývoj a životaschopnost, neboť *Chk1*^{-/-} myši vykazují časnou embryonální letalitu (Liu et al 2000, Takai et al 2000), což kontrastuje jak s životaschopností *Chk1*-mutant u kvasinek (Walworth & Bernards 1996), tak s bezproblémovým dělením *Chk1*-deficientních ptačích DT40 buněk (Zachos et al 2003b). Společným znakem obou zmíněných *Chk1*-deficientních životaschopných buněčných typů je však narušení G₂/M – kontrolního bodu při poškození DNA a problémy s procesivitou replikační vidlice, svědčící o účasti CHK1 na replikaci DNA (Zachos et al 2003a).

Chk2^{-/-} myši jsou životaschopné a plodné (Takai et al 2002). Dominantním fenotypem je zvýšená rezistence vůči ionizujícímu záření, defekty ve funkci p53 a indukci apoptózy. Zdá se tedy, že ačkoliv CHK2 hraje určitou roli v těchto dějích, není pro buňku zcela nezbytná anebo je částečně nahraditelná (Antoni et al 2007).

CHK1 i CHK2 patří mezi Ser/Thr kinázy, obě se účastní odpovědi buňky na poškození DNA (Zhou & Bartek 2004) a některé substráty mají společné. Přestože se jejich funkce zčásti překrývají, jsou strukturně odlišné (Obr.2).

Checkpoint kináza 1 obsahuje na N – konci kinázovou doménu, která je silně zachována u mnoha druhů živočichů, a regulační doménu na C- konci, jež má zásadní význam v regulaci kinázové aktivity CHK1 (Palermo et al 2008). Významná fosforylační místa v regulační doméně se nacházejí v blízkosti SQ/TQ konsensus sekvence (bohatá na aminokyseliny Ser, Gln a Thr). Jsou znázorněny také důležité molekuly odpovědné za fosforylaci jednotlivých míst (Chen & Poon 2008). Krystalová struktura ukázala, že protein se v nemodifikované (nefosforylované) formě nachází v otevřené konformaci, tedy katalyticky aktivní, avšak C – terminální doména negativně reguluje kinázovou aktivitu, do doby, než je tato doména fosforylována (Chen et al 2000).



Obrázek 2: Schematické znázornění sekvenční homologie mezi CHK1 a CHK2. Převzato z (Chen & Poon 2008)

Na rozdíl od CHK1 jsou funkční domény CHK2 uspořádány odlišně. Kinázová doména je lokalizována na C – konci proteinu a SQ/TQ motiv zase na N – konci. Navíc obsahuje checkpoint kináza 2 doménu FHA (forkhead-associated), která hraje důležitou roli při dimerizaci a následné aktivaci CHK2 molekul (Antoni et al 2007).

Poškození DNA a aktivace checkpoint kináz

Ionizující nebo UV záření jsou známé faktory způsobující jednořetězcové nebo dvojřetězcové (DSB) zlomy v DNA. Odpověď buňky na poškození DNA je možné charakterizovat jako soubor signálních drah (*DNA damage pathways*), které mohou vést k zastavení buněčného cyklu, aktivaci kontrolních bodů, opravě DNA, modifikaci transkripce a nebo i k indukci apoptózy. Tyto dráhy sestávají z mnoha proteinových komplexů a molekul. V savčích modelech můžeme molekuly těchto signálních drah rozlišit na senzory DNA poškození, mediátory (zprostředkovatele), přenašeče signálu a efekторы (cílové proteiny) (Zhou & Elledge 2000). Uvedená klasifikace není definitivní, spíše orientační, protože řada proteinů má širší spektrum aktivity.

Ačkoliv přímé senzory DNA poškození dosud nebyly identifikovány, Rad9, Rad1 a Hus1 jsou možnými kandidáty této role. V lidských buňkách i u kvasinek tvoří tyto molekuly heterotrimerický komplex (9-1-1 komplex), který se váže na DNA v místě poškození. Vazba je pravděpodobně regulována ještě pomocí Rad17 komplexu (Niida & Nakanishi 2006).

Mezi mediátory lze zahrnout Mre11, Rad50, Nbs1 proteiny tvořící dohromady MRN nukleázový komplex, MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint 1) protein a také BRCA1 (breast cancer susceptibility gene 1). MRN komplex je schopen lokalizace do míst DSB podobně jako senzory DNA poškození. MDC1 je rekrutován do blízkosti DSB, kde se váže na fosforylované C – terminální konce modifikované formy histonu H2AX, který značí okolí dvojřetězcového zlomu na DNA. (Lukas et al 2004a).

Proximální kinázy ATM (ataxia-telangiectasia mutated) a ATR (ataxia-telangiectasia and Rad3 related), patřící do rodiny fosfatidylinozitol 3-kináz (PI3K), plní funkci přenašečů signálu. Dříve se předpokládalo, že obě tyto kinázy jsou aktivovány odlišným typem poškození DNA. Recentní práce (Jazayeri et al 2006) však ukazuje, že aktivace ATR je závislá na ATM. Lokální změna topologie chromatinu vyvolaná v důsledku dvojřetězcového zlomu indukuje autofosforylaci ATM dimerů (Ser 1981) přímo v místě DSB, což vede k disociaci na aktivní monomery. Bylo ukázáno, že aktivní ATM fosforyluje Nbs1 a to usnadňuje vazbu MRN komplexu na poškozenou DNA. Nukleázová aktivita Mre11 proteinu poté umožní zpracování dsDNA (*double stranded DNA*) v místě zlomu na ssDNA (*single stranded DNA*), která je vzápětí pokryta RPA (*replication protein A*) proteinem. Na něj se pomocí ATRIP (*ATR-interacting protein*) váže ATR (Bartek et al

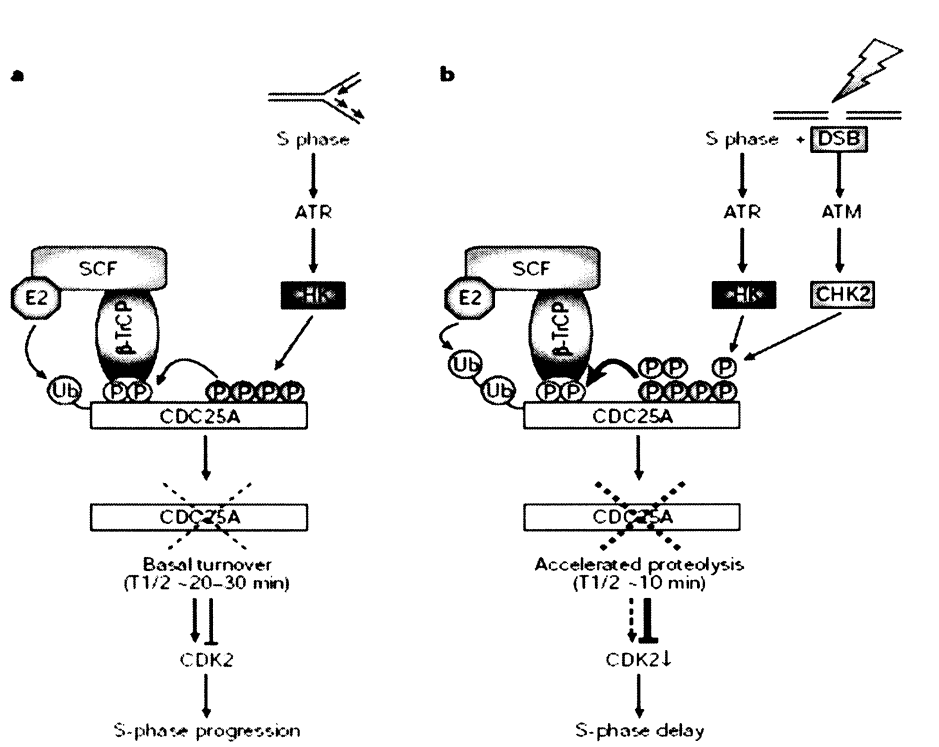
2004). Na rozdíl od ATR nezůstává ATM vázána v DSB – místě aktivace, ale disociuje a může tak aktivovat i vzdálené substráty, mezi které patří například výše zmíněný Nbs1 protein, dále H2AX, SMC1 a CHK2. Histon H2AX je fosforylován ATM kinázou, což umožní vazbu MDC1 a MRN komplexu, které opět vázají ATM, a ta fosforyluje další H2AX. Takto dochází k šíření signálu na obě strany od místa poškození DNA (Lukas et al 2004a). SMC1 (*structural maintenance of chromosomes 1*) je kohezinový protein, jehož fosforylace ATM kinázou je umožněna přítomností MDC1 a MRN komplexu a způsobí dočasné zastavení replikační vidlice. CHK2, efektorová kináza, je pravděpodobně hlavním substrátem ATM, která fosforyluje CHK2 na Thr68. Tato fosforylace je nezbytná pro iniciální aktivaci, ale není nutná pro její kinázovou aktivitu. Po iniciální aktivaci dochází k dimerizaci a trans-autofosforylaci na Thr383, Thr387. Aktivace CHK2 se nejspíše děje právě v DSB, v místě, kde je aktivována ATM, poté také disociuje a funguje jako šířitel signálu po celém jádře (Lukas et al 2003). Mezi substráty checkpoint kinázy 2 patří například BRCA1, E2F, CDC25 fosfatázy a p53. Regulací p53 se CHK2 podílí na inhibici cyklin dependentních kináz (CDK) a na indukci apoptózy.

Aktivovaná ATR zůstává vázána v místě aktivace. Překvapivě bylo zjištěno, že ATM-dependentní ATR aktivace je závislá na fázi buněčného cyklu – probíhá pouze v S a G₂ – fázi (Jazayeri et al 2006). Použitím roscovitinu, inhibitoru CDK, bylo zabráněno vytvoření ssDNA a aktivaci ATR. Podobně bylo zabráněno také opravě DNA cestou homologii rekombinace vyžadující ssDNA jako substrát. Z toho plyne, že k aktivaci ATR je nutná cyklin dependentní kináza 2 (CDK2), která je aktivní v S a G₂ – fázi.

Majoritním substrátem ATR je další efektorová kináza, checkpoint kináza 1 (Syljuasen et al 2005). V případě poškození DNA je aktivována v jádře, pravděpodobně v místě DSB, kde byla aktivována ATR. Byla však popsána také centrosomální lokalizace CHK1 v důsledku poškození DNA (Niida et al 2007). CHK1 je fosforylována ATR kinázou na Ser317 a Ser345 (Capasso et al 2002, Zhao & Piwnica-Worms 2001). Kromě ATR jsou k aktivaci CHK1 vyžadovány také adaptorové proteiny, jejichž funkcí je usnadnění aktivace (Chen & Sanchez 2004). Patří mezi ně například Claspin nebo TopBP1 (*DNA topoisomerase II-beta binding protein 1*). TopBP1 kolokalizuje s ATR v místě poškození a přestože jeho deplece pomocí RNAi zabránila fosforylaci ATR substrátů, neznemožnila lokalizaci ATR v místě poškození. TopBP1 hraje navíc důležitou roli v interakci mezi proteinem Claspin a CHK1 (Liu et al 2006). Claspin zůstává před i po poškození DNA distribuován v celém jádře, jeho deplece zabránila fosforylaci CHK1, ale ne dalších substrátů ATR. Zdá se také, že se podílí na monitorování DNA replikace v průběhu S – fáze (Lee et

al 2003, Yang et al 2008). Tuto hypotézu podporuje také nově popsaná interakce CHK1 s PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), který je nezbytnou komponentou replikační mašinerie (Brondello et al 2007, Scora et al 2008). Na druhou stranu deplece CDC6 proteinu, který je nezbytný pro vytvoření replikačních počátků v rané S – fázi, nevedla k aktivaci CHK1 i přes výrazné abnormality při replikaci (Lau et al 2006). Mezi hlavní substráty CHK1 patří CDC25 fosfatázy, dále však i protein p53, WEE1, Aurora-B nebo TLK- kinázy.

Ze spektra známých substrátů CHK1 a CHK2 vidíme, že mnohé jsou oběma kinázám společné. Regulací těchto efektorových proteinů se podílí na řízení důležitých buněčných dějů, jakými jsou replikace DNA, přechody mezi fázemi buněčného cyklu, remodelace chromatinu a apoptóza. Jako typický příklad spolupráce checkpoint kináz 1 a 2 lze uvést ubiquitin-dependentní proteolytickou degradaci CDC25A fosfatázy, klíčového regulátoru cyklin dependentní kinázy 2 (CDK2) (Sorensen et al 2003). Proteolýza CDC25A probíhá neustále, jeho aktivita je ovlivňována mírou degradace. V normálním buněčném cyklu, nenarušeném poruchami DNA nebo replikačního aparátu, dochází k bazálnímu metabolickému obratu CDC25A (poločas rozpadu zhruba 20-30 minut), který umožňuje přiměřenou aktivaci CDK2, zajišťující obvyklý průběh S – fázi (Obr.3a).



Obrázek 3: Degradace CDC25 fosfatázy indukovaná CHK1 a CHK2 kinázami. Převzato z (Bartek et al 2004)

Za degradaci CDC25A je odpovědná CHK1, která fosforyluje tuto fosfatázu na četných serinových reziduích, v důsledku čehož dochází k vazbě SCF (E3 – ubiquitin ligáza), ubiquitinaci a odbourání CDC25A v proteasomu. Tato aktivita CHK1 svědčí o její fyziologické roli v buněčném cyklu. Situace se mění, pokud dojde k poškození DNA (Obr.3b), kdy je aktivována také CHK2. Ta také fosforyluje CDC25A hlavně na Ser123, ale i dalších serinových reziduích a tím přispívá k aktivitě CHK1. Tímto způsobem dojde k výrazné akceleraci proteolýzy CDC25A (poločas rozpadu menší než 10 minut) a k zastavení buněčného cyklu (Bartek et al 2004).

Vzájemná spolupráce CHK1 a CHK2 naznačuje jistý vztah mezi těmito kinázami, kde CHK1 hraje roli neúnavného dříče, zatímco CHK2 funguje pouze jako jakýsi zesilovač účinku v případě poškození DNA. Tato úloha CHK1 během neovlivněného buněčného cyklu může být příkladem toho, proč je tento gen nezbytný pro savčí vývoj, jak o tom vypovídá jeho knock-out. Podobně role CHK2, aktivní až v případě poškození DNA, může vysvětlit, proč je tato kináza postradatelná pro savčí vývoj a životaschopnost (Bartek & Lukas 2003).

Na základě dosavadních poznatků o signálních drahách byla navržena hypotéza o dvojí cestě k zastavení buněčného cyklu (Lukas et al 2004b). Takzvaná akutní odpověď na poškození DNA probíhá pouze v S a G₂ – fázi a zahrnuje aktivaci ATM i ATR a jejich substrátů CHK1 a CHK2, které umožní rychlou aktivaci kontrolního bodu, k čemuž dojde jak degradací CDC25A, tak fosforylací SMC1. Tato odpověď je nezávislá na p53 a je dočasná. Takzvaná zpožděná odpověď na poškození DNA je trvalejší a probíhá hlavně v G₁ – fázi, kdy je nízká aktivita CDK kináz, a proto dochází pouze k aktivaci ATM, která aktivuje CHK2 a ta zase p53. Zastavení buněčného cyklu je v tomto případě dosaženo expresí p21 (přirozeného inhibitoru CDK)(Bartek & Lukas 2001).

Fyziologické role CHK1

CDC 25 (cell division cycle 25) fosfatázy se výrazně podílí na regulaci buněčného cyklu. Díky své duálně-specifické aktivitě jsou schopné defosforylovat CDK kinázy na Thr14 a Tyr15, a tím je aktivovat. CHK1 může vázat a fosforylovat všechny tři členy savčí rodiny CDC25 fosfatáz: CDC25A, CDC25B a CDC25C (Sanchez et al 1997). Tím je dosaženo přímého spojení mezi CDK kinázami a signálními drahami aktivovanými v důsledku poškození DNA (Donzelli & Draetta 2003).

CDC25C je v průběhu cyklu na úrovni proteinu stabilní, na rozdíl od ostatních dvou izoform. Bylo ukázáno, že CHK1, aktivovaná zastavením replikace nebo poškozením z ozáření, je schopná fosforylovat CDC25C na Ser216 (Peng et al 1997), což umožňuje vazbu 14-3-3 proteinu, který negativně reguluje aktivitu fosfatázy, pravděpodobně změnou lokalizace proteinu do cytoplasmy. Fosforylace na Ser216 se ale objevuje i v průběhu normální S a G₂ – fáze a to nasvědčuje tomu, že CHK1 je aktivní i bez přítomnosti DNA poškození a reguluje aktivitu CDC25C až do mitózy, kdy dochází k její hyperfosforylaci a aktivaci CDK1/cyklin B komplexem (Kaneko et al 1999). Podle nejnovějších výsledků také víme, že aktivace CDC25C v normálním buněčném cyklu probíhá na centrosomu, podobně jako CDC25B, přestože byla považována za výhradně jaderný protein (Bonnet et al 2008).

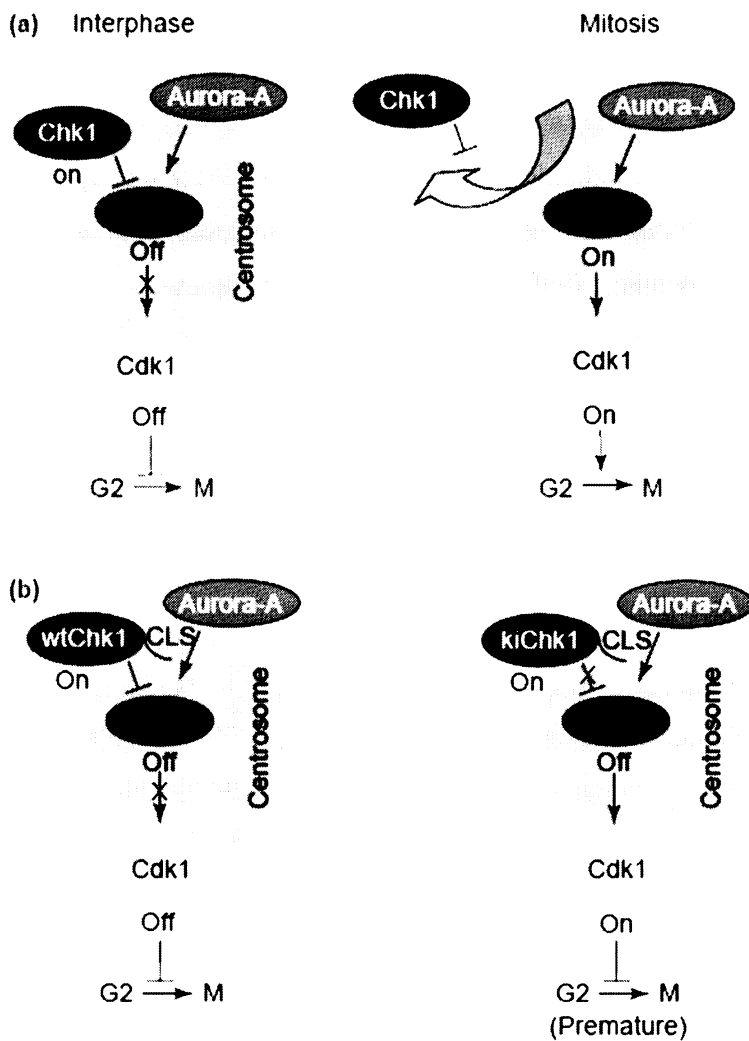
Exprese CDC25A začíná v G₁ – fázi a je závislá na transkripčních faktorech E2F a c-Myc. Její aktivita je nezbytná pro aktivaci CDK2/cyklin E komplexu, hlavního regulátoru replikace DNA. Jak již bylo uvedeno ve třetí kapitole, CHK1 fosforyluje CDC25A i v průběhu běžné replikace DNA, čímž udržuje její metabolický obrat (Sorensen et al 2003). Degradace CDC25A je v případě genotoxického stresu velmi urychlena (Mailand et al 2000). CDC25A fosfatáza je kritickou také pro regulaci G₂/M přechodu. S ohledem na její funkci při zahájení syntézy DNA bylo zjištěno, že na rozdíl od asynchroních buněk, je CDC25A výrazně stabilizována v mitotických buňkách. Tato stabilizace je zprostředkována CDK1/cyklin B komplexem a byla ověřena inhibicí CDK1 pomocí roscovitinu, kdy pokles CDK1 aktivity koreloval s poklesem CDC25A proteinu. CDK1/cyklin B *in vitro* fosforyluje CDC25A na Ser17 a Ser115, čímž odpráhuje CDC25A od ubiquitin-dependentní degradace (Mailand et al 2002). Negativním regulátorem CDC25A před zahájení mitózy je CHK1, která fosforylaci na Ser178 a Thr507 usnadňuje

vazbu 14-3-3 proteinu. Tím je zabráněno interakci s CDK1/cyklin B komplexem (Chen et al 2003).

Nutnost správné regulace CDC25A vyplývá z množství zhoubných nádorů, kde je tato fosfatáza silně overexprimována, čehož může být dosaženo i umělou deplecí jejího přirozeného regulátoru – CHK1 (Lam et al 2004, Ray et al 2007a).

CDC25B fosfatáza je syntetizována již od S- fáze a hraje důležitou roli při vstupu do mitózy. Na rozdíl od obou svých příbuzných fosfatáz, dominantně jaderných proteinů, je lokalizována především v cytoplasmě. Během G₂ – fáze dochází k její akumulaci na centrosomu, kde také probíhá iniciální aktivace CDK1/cyklin B komplexu v profázi mitotického cyklu (Jackman et al 2003, Lindqvist et al 2005). Centrosomální CDC25B je fosforylována, a tím aktivována, na Ser353 mitotickou kinázou Aurorou-A, která také lokalizuje na centrosom (Dutertre et al 2004). Ukázalo se, že i v tomto případě hraje CHK1 důležitou regulační roli – k fosforylaci CDC25B nedošlo při uměle navozeném G₂ /M – kontrolním bodě, ale byla obnovena po aplikaci UCN-1, inhibitoru CHK1 (Cazales et al 2005). Toto zjištění bylo překvapivé právě z toho důvodu, že checkpoint kináza 1 byla považována za výhradně jaderný protein, který se účastní signalizace v důsledku poškození DNA (kap.3). Imunofluorescenční analýzou však byla prokázána kolokalizace monoklonální protilátky proti CHK1 s C-Nap1 proteinem a γ -tubulinem, potvrzující její lokalizaci na centrosom. Naproti tomu dělicí vřeténka mitotických buněk nebyla protilátkou proti CHK1 značena vůbec. Signál na centrosomu mizí právě před vstupem do mitózy, což svědčí o výhradně interfázni lokalizaci CHK1 na centrosom (Kramer et al 2004b).

Pokud se CDC25B na centrosomu setkává s CHK1 kinázou – svým negativním regulátorem, a k iniciální aktivaci cyklin dependentní kinázy 1- hlavního regulátoru mitózy, dochází na tomtéž místě, je zřejmé, že CHK1 má nepřímý vliv na zahájení mitózy. Práce Kramera et al (2004b) to potvrzuje důmyslným experimentem, kdy byly připraveny wild-type a kinase-inactive verze GFP-CHK1 fúzované s PACT (pericentrin - AKAP 450 centrosomal targeting) doménou AKAP450 proteinu pericentriolární matrix, která fungovala jako centrosomální lokalizační signál (CLS). Díky této doméně byly obě dvě verze GFP-CHK1 cíleně lokalizovány na centrosom i v G₂/M přechodu. Zatímco wild-type GFP-CHK1-PACT(wtChk1) si zachovala CHK1 kinázovou aktivitu a zabránila předčasné aktivaci CDK1, kinase-inactive GFP-CHK1-PACT(kiChk1) nebyla schopná CDK1 inhibice a došlo k předčasnému vstupu do mitózy (Obr.4b).



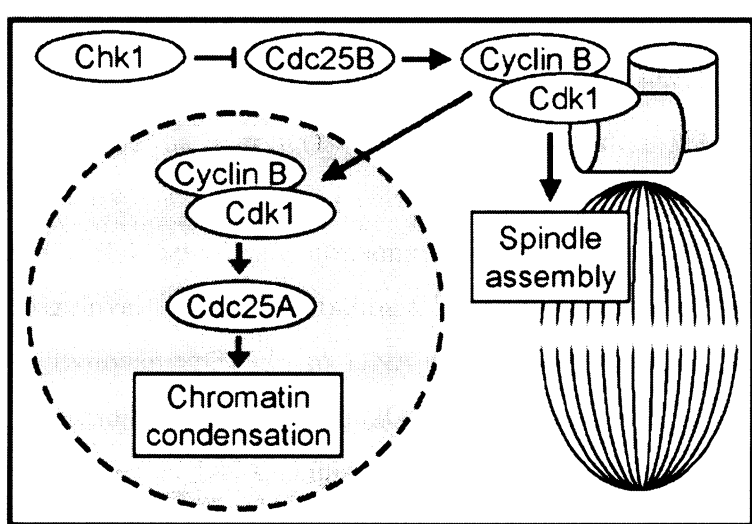
Obrázek 4: Model regulace cyklin dependentní kinázy 1 (CDK1) na centrosomu. Převzato z (Doxsey et al 2005b)

CHK1 tedy reguluje aktivitu CDK1 prostřednictvím CDC25B fosfatázy. V interfázi je CHK1 lokalizovaná na centrosomu a inhibuje CDC25B, čímž je zabráněno předčasnému spuštění mitózy. V G_2/M přechodu naopak CHK1 disociuje z centrosomu a mitotická kináza Aurora-A fosforyluje CDC25B, která pak může defosforylovat CDK1 a tím zahájit mitotický cyklus (Obr.4a)(Doxsey et al 2005b).

Následně vyšlo najevo, že CHK1 fosforyluje CDC25B na čtých serinových reziduích (např. Ser230 a Ser563) v důsledku poškození DNA (Bansal & Lazo 2007), ale i bez přítomnosti poškození DNA, a to jak *in vitro*, tak *in vivo*, přičemž Ser230-fosforylovaná forma CDC25B je lokalizována na centrosom od časně S – fáze až do mitózy (Schmitt et al 2006).

Pozoruhodné je, že chemická inhibice CHK1 pomocí inhibitoru CEP3891 vede k normální výstavbě dělicího vřeténka, avšak i k výrazné mislokalizaci chromatinu (Loffler et al 2006b). Tento efekt byl nazván “*paraspindle phenotype*“ . Na základě známých výsledků o vlivu CHK1 na CDC25 fosfatázy se předpokládalo, že inhibicí CHK1 došlo k upregulaci těchto fosfatáz, což způsobilo daný fenotyp. A skutečně bylo pomocí siRNA proti CDC25B dosaženo navrácení normálního fenotypu. Nicméně siRNA proti CDC25A vyvolala pouze částečnou tendenci k návratu do normálu. Stejně tak overexprese CDC25B efektivně vyvolala “*paraspindle phenotype*“, zatímco CDC25A nikoliv.

Formace mitotického vřeténka a kondenzace chromatinu jsou tedy pravděpodobně dva na sobě nezávislé děje, které vyžadují určitou synchronizaci. Inhibice CHK1 vede k asynchronizaci těchto dějů v důsledku deregulace CDC25B, která předčasně aktivuje CDK1 a ta zase výstavbu dělicího vřeténka, ovšem bez dokončené kondenzace chromatinu. Ze studie Lofflera et al (2006b) vyplývá nová možná fyziologická funkce CHK1 jako koordinátor dějů vedoucích ke vstupu do mitózy, kdy správně načasované uvolnění CDC25B umožní iniciální aktivaci CDK1/cyklin B komplexu na centrosomu, a jeho následnou translokaci do jádra, kde aktivuje CDC25A a kondenzaci chromatinu (Obr.5).



Obrázek 5: Schéma možné regulace výstavby dělicího vřeténka a kondenzace chromatinu. Převzato z (Loffler et al 2006b).

Jak vidíme, centrosom je místem setkání různých regulačních proteinů, jejichž vzájemná interakce je lokalizací na centrosom výrazně usnadněna (Doxsey et al 2005a). Předpokládá se, že centrosom slouží jako podpůrná konstrukce (scaffold) k ukotvení četných signálních drah, jako pevný bod umožňující integraci komplexních regulačních sítí. Tyto představy jsou založeny na rostoucím počtu s centrosomem spojených regulačních proteinů. Objevuje se nový pohled na centrosom jako jedno z řídicích center, integrující pozitivní i negativní signální dráhy, které ovlivňují progresi buněčného cyklu (Kramer et al 2004a).

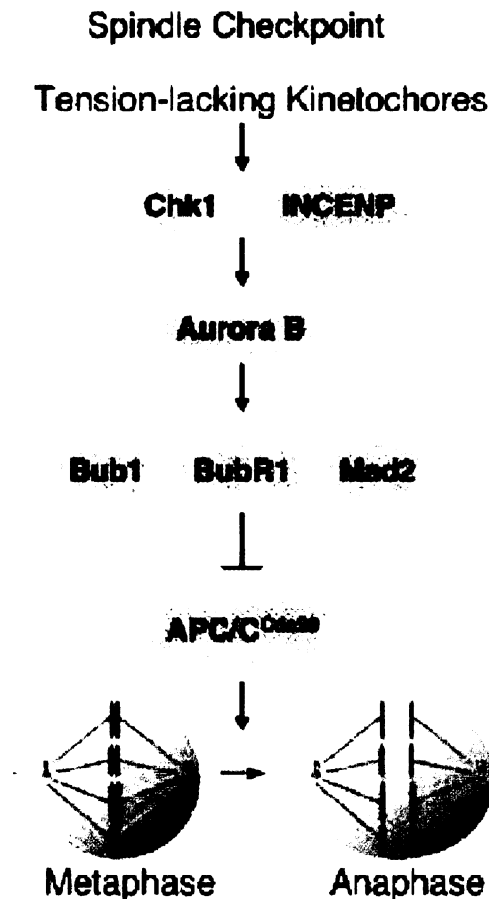
Mezi proteiny asociující s centrosomem patří CHK1, CDC25B, Aurora-A, CDK1 a cyklinB, dále také CHK2, p53, BRCA1, TopBP1, Plk1, MAPs a řada dalších. Mnohé z těchto molekul jsou kromě své regulační funkce nezbytné i pro funkci centrosomu samotného. CDC25B se podle velmi recentní práce účastní duplikace centriol – klíčových struktur uvnitř centrosomu (Boutros & Ducommun 2008). Inhibice CDC25B pomocí siRNA způsobila akumulaci buněk v G_2 – fázi se separovanými centrosomy obsahující pouze jednu centriolu. CDK1, jejíž malé množství aktivované na centrosomu iniciuje v G_2/M – přechodu separaci centrosomů, je dále v jádře aktivována i po zahájení mitózy a tento nárůst aktivity CDK1 je nezbytný pro vstup do anafáze (Lindqvist et al 2007). CHK1 před mitózou disociuje z centrosomu, nicméně i v průběhu mitotického dělení dochází k její fosforylaci a to přímo CDK1 kinázou na Ser286 a Ser301 (Obr.2), zatím z neznámých důvodů (Shiromizu et al 2006). Stejně tak zůstává nejasná právě objevená schopnost CHK1 vázat se na chromatin a fosforylovat histon H3 na Thr11, čímž hypoteticky může být aktivována transkripce (Shimada & Nakanishi 2008).

Během mitózy byly překvapivě na centrosomu nalezeny i ATM a ATR kinázy . Má se za to, že by mohly regulovat formaci γ - tubulinu a kinetiku mikrotubulů, a tím by tyto děje mohly být přímo ovlivňovány případným DNA poškozením, které způsobuje disociaci ATM i ATR z centrosomu (Zhang et al 2007). Oproti tomu v normálních lidských fibroblastech vyvolá poškození DNA akumulaci CHK1 na centrosomu, která přetrvává i při inhibici ATM/ATR dráhy a je nutná k navození G_2/M – kontrolního bodu (Loffler et al 2007). Zlomy v DNA mohou také vést k amplifikaci centrosomů, jež je ovšem závislá na CHK1, protože k amplifikaci po inhibici CHK1 nedojde (Bourke et al 2007). Tento jev nejspíše představuje jakýsi záložní mechanismus pro eliminaci poškozených buněk neschopných aktivace kontrolního bodu (Loffler et al 2006a).

Dalším důkazem o tom, že CHK1 je aktivní v neovlivněném buněčném cyklu, je velmi recentní práce (Zachos et al 2007) indikující fyziologickou roli CHK1 v *spindle assembly checkpoint* (SAC).

Tento kontrolní bod zajišťuje přesnost segregace chromozomů pozastavením mitózy před vstupem do anafáze, dokud nejsou všechny chromatidy správně připojeny ke kinetochorovým mikrotubulům dělicího vřeténka. SAC je aktivován samovolně – spouští jej signál kinetochor sesterských chromatid, které nejsou připojeny k mikrotubulu a/nebo postrádají pnutí vyvolané dělicím vřeténkem. Taková situace nastává během každé prometafáze, kdy dojde k rozpadu jaderné membrány a chromozomy volně plavou v cytoplasmě (Zachos & Gillespie 2007). Aktivace SAC zahrnuje vazbu proteinů rodiny MAD a BUB na kinetochory nepřipojených chromatid. Tyto proteiny jsou nezbytné k inhibici APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) ubiquitin ligázy odpovědné za degradaci securinu a cyklinu B (Peters 2006). Odbouráním těchto molekul je aktivována separáza a stěpen kohezin, což jsou procesy zahajující anafázi. Předčasnou aktivací APC/C by došlo k nerovnoměrnému rozdělení chromozomů do dceřiných buněk a vzniku aneuploidii.

Zachos et al (2007) identifikovali novou mitotickou úlohu CHK1 v regulaci SAC. Ukázali, že Chk1-deficientní ptačí DT40 buňky vykazují chyby v segregaci chromozomů a abnormální karyotypy. Tyto buňky po ošetření taxolem (mitotická droga narušující dělicí vřeténko stabilizací mikrotubulů), nejsou schopny aktivovat spindle assembly checkpoint a zastavit průběh mitózy. Ošetření Chk1^{-/-} DT40 buněk nocodazolem (mitotická droga narušující dělicí vřeténko úplnou depolymerací mikrotubulů) však kontrolní bod a zastavení mitózy způsobilo. Exprese wild-type CHK1, avšak ne kinase-inactive CHK1, umožnila aktivaci SAC i v přítomnosti taxolu. Tyto výsledky svědčí o nutnosti CHK1 kinázové aktivity pro funkci tohoto kontrolního bodu (Zachos et al 2007). Pomocí GFP-CHK1 fúzního proteinu byla u DT40 buněk zjištěna lokalizace CHK1 na kinetochorech v prometafázi. Zde se také lokalizuje Aurora-B kináza, která aktivuje proteiny MAD2, BUB1 a BUBR1. Stimulaci aktivity Aurory-B zajišťuje INCENP (inner centromere protein). Zachos et al zjistili, že CHK1 je schopná fosforylovat a aktivovat Auroru-B nezávisle na INCENP. To znamená, že CHK1 je pravděpodobně odpovědná za regulaci Aurory-B a tím i za optimální funkci MAD a BUB proteinů, zajišťující správné načasování anafáze (Obr.6).



Obrázek 6: Zjednodušené schéma funkce CHK1 v spindle checkpoint signalizaci. Převzato z (Yu 2007).

Nezbytnost checkpoint kinázy 1 pro správnou funkci SAC podporují také další práce, kde inhibice nebo nepřítomnost CHK1 znemožnila aktivaci SAC a vedla k abnormálnímu průběhu mitózy či aktivaci p53 a buněčné smrti (Carrassa et al 2008, Vitale et al 2007). Velmi nedávno se objevila také práce, která překvapivě ukazuje, že seskupení SAC proteinů (především MAD a BUB proteinů) nemusí probíhat výhradně na kinetochorech nepřipojených chromatid, a že spindle checkpoint je úzce spjat s kontrolním bodem detekujícím poškození DNA (Kim & Burke 2008).

Tyto recentní poznatky o nové funkci CHK1 v mitóze dále odhalují, jak komplexní roli tato kináza hraje v regulaci buněčného cyklu. Pro úplné pochopení všech funkcí CHK1 v buněčných procesech je třeba věnovat ještě značné úsilí a studium, jehož výsledky nám snad poté umožní lépe pochopit rozdíly mezi normálními a nádorovými buňkami. Z toho důvodu je CHK1 připisována role nádorového supresoru a potenciálního cílu protirakovinné terapie.

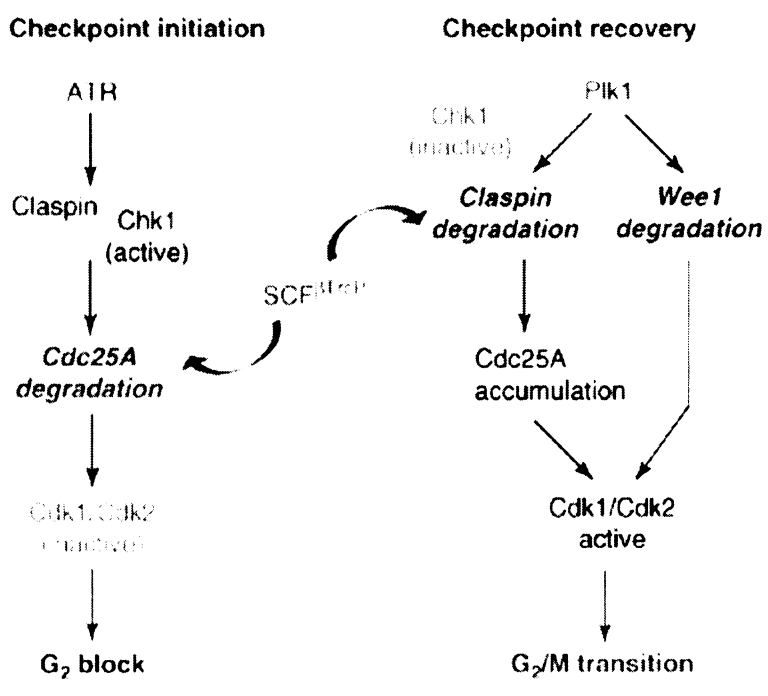
Návrat z kontrolního bodu

Mnoho prací se zabývá aktivací kontrolních bodů v důsledku poškození DNA nebo jiných defektů, kvůli kterým je nutné pozastavení buněčného cyklu, avšak velmi málo je známo o vypnutí kontrolního bodu a návratu do buněčného cyklu po dokončení opravy DNA. V případě G₂ – kontrolního bodu se předpokládají nejméně tři možné mechanismy terminace, které se navíc navzájem nevylučují.

Prvním mechanismem je defosforylace proteinů, které byly fosforylovány právě kvůli aktivaci kontrolního bodu. U kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* byla popsána izoforma protein fosfatázy typu 1 označená jako Dis2, která *in vitro* způsobila defosforylaci fosfoSer345-CHK1 peptidu a zabránila aktivaci CHK1 *in vivo* (den Elzen & O'Connell 2004). Aktivita Dis2 byla nezbytná k inaktivaci CHK1 a správně načasovanému návratu do cyklu, overexprese této fosfatázy vedla k předčasnému opuštění G₂ – kontrolního bodu a abnormálnímu průběhu mitózy. Stále však není jasné, jakým způsobem je Dis2-dependentní CHK1 inaktivace regulována. Jednou z možností se zdá být vazba 14-3-3 a/nebo Crb2 proteinů na fosfoSer345-CHK1, jež by bránila defosforylaci CHK1 (den Elzen et al 2004).

Druhým mechanismem vypnutí G₂ – kontrolního bodu je ubiquitin-dependentní proteolytická degradace adaptorového proteinu Claspin a CDK-inhibující kinázy WEE1. Fosforylace těchto dvou molekul PLK1 kinázou funguje jako signál k ubiquitinaci, který je rozpoznán β-TrcP F-box proteinem, určujícím substrátovou specifitu SCF ubiquitin ligázy. Tímto způsobem dojde k degradaci nezbytného koaktivátoru CHK1 – Claspinu, což umožní akumulaci CDC25A, a degradaci přímého inhibitoru CDK1 kinázy - WEE1 (Bartek & Lukas 2007). Oba tyto procesy probíhají právě opačným směrem než při aktivaci kontrolního bodu a vedou k opětovné aktivaci cyklin dependentních kináz a k zahájení mitózy (Obr.7).

Za třetí možnost se považuje skutečnost, že některé signální dráhy působí protichůdně než CHK1 a mohou zvrátit její vliv na dané substráty. Například výše zmíněná protein fosfatáza typu 1 je kromě defosforylace CHK1 schopná defosforylovat také CDC25C, a to právě v místě, které je fosforylováno CHK1 kinázou (Ser287). Stejně tak pozitivní vliv CHK1 na WEE1 kinázu může být zvrácen negativním působením Cdr1 a Cdr2 kináz (Calonge & O'Connell 2008).



Obrázek 7: SCF-dependentní aktivace a inaktivace G₂ – kontrolního bodu. Převzato z (Bartek & Lukas 2007).

Recentní data také naznačují existenci mechanismu, který stojí na hraně mezi rozhodnutím buňky inaktivovat kontrolní bod nebo podstoupit apoptózu. V případě silného genotoxického stresu, když buňka není schopna opravit poškozenou DNA, jsou aktivovány kaspázy, které štěpí četné proteiny účastníci se opravy DNA. Mezi ně překvapivě patří i CHK1. Je štěpena kaspázami pouze při podání nadprahové dávky etoposidu nebo cisplatiny (látky poškozující DNA), nikoliv při dávce nižší (Okita et al 2007). CHK1 tak může hrát roli určujícího faktoru pro smrt nebo přežití buňky.

CHK1 v meióze

Meiotické zrání je proces maturace oocyty, jehož prvotním znakem je znovuzahájení meiózy. Oocyty jsou během svého růstu zastaveny v profázi prvního meiotického dělení, v GV-stádiu. In vivo vyžaduje znovuzahájení meiózy hormonální stimul. U savců je jím LH hormon, u *Xenopus leavis* progesteron nebo insulin. Zrání oocyty představuje přechod z profáze I. do metafáze II., kde se oocyt opět zastavuje a čeká na oplození. Uvolnění z profáze I. je vždy provázeno aktivací MPF (M - phase promoting factor) označující komplex CDK1/cyklin B. Nejen z tohoto důvodu lze znovuzahájení meiózy přirovnat ke G_2/M – přechodu somatických buněk. V obou případech jde o procesy závislé na CDK1, buňky mají replikovanou DNA a ta po aktivaci CDK1 kondenzuje.

O funkci CHK1 v meióze toho oproti somatickým buňkám víme velmi málo. U modelu *Xenopus* je známo, že CHK1 je v oocytech přítomná, na úrovni proteinu je exprimována konstantně v průběhu zrání a podílí se na udržení oocyty v profázi I (Nakajo et al 1999). Na savčím modelu nebyla o CHK1 v meióze zatím publikována žádná data. O její přítomnosti a potenciální funkci můžeme usuzovat pouze na základě znalostí o jejích substrátech.

CDC25 fosfatáza u *Xenopus* oocytů je homologní lidské CDC25C a je zde skutečně také regulována cytoplasmatickou CHK1 kinázou, která ji fosforyluje na Ser287, čímž ji inhibuje (Oe et al 2001). Tyto výsledky podporují výše uvedené tvrzení, že CHK1 hraje roli v udržení profáze I. skrze inhibici CDC25C. Kromě CHK1 však oocyty v profázi I. udržuje také MYT1 kináza inhibující přímo CDK1 a protein kináza A (PKA), která má také inhibiční vliv na CDC25C (Kishimoto 2003). Na myším modelu bylo pomocí knock-outu prokázáno, že CDC25C je pro meiotický cyklus postradatelná, oocyty normálně zrají a jsou oplození schopné (Chen et al 2001).

Naproti tomu CDC25A^{-/-} myši vykazují časnou embryonální letalitu (Ray et al 2007b). Protože se tato fosfatáza výrazně podílí na vstupu do mitózy (kap.4), dá se předpokládat i její funkce při znovuzahájení meiózy. Velmi recentně byla publikována práce, prokazující přítomnost jaderného CDC25A proteinu již v GV-stádiu myších oocytů, přičemž v průběhu zrání hladina proteinu klesá v závislosti na CDK1 (Solc et al 2008). Tento pokles je nezbytný k přechodu z MI do MII stádia a k formaci funkčního dělicího vřeténka, protože overexprese CDC25A vede k defektům ve výstavbě vřeténka a kongresi chromozomů. Navíc exprese exogenní CDC25A překoná cAMP-dependentní GV-blok,

což značí úlohu CDC25A v samotném znovuzahájení meiózy. Z těchto výsledků lze usoudit, že CHK1 i zde nejspíše zastává důležitou regulační roli, neboť CDC25A je jejím důležitým substrátem, nicméně data prozatím chybí.

CDC25B/- myši jsou životaschopné avšak samice jsou sterilní, protože oocyty zůstávají v GV-stádiu s nízkou MPF aktivitou (Lincoln et al 2002). Mikroinjekcí CDC25B mRNA bylo dosaženo aktivace MPF a znovuzahájení meiózy, indikující nutnost této fosfatázy pro meiotické zrání. Bylo také zjištěno, že CDC25B je cytoplasmatický protein (Solc et al 2008), což se shoduje se situací u somatických buněk, kde se CDC25B podílí na regulaci cytoplasmatických událostí (hlavně na centrosomu), zatímco CDC25A na regulaci jaderných událostí (kap.4). Obě fosfatázy jsou přitom regulovány checkpoint kinázou 1, a proto se tato její funkce dá očekávat i v meióze.

Aurora-A kináza v mitóze lokalizuje na centrosom, kde fosforyluje CDC25B poté, co CHK1 disociuje z centrosomu. V myších oocytech je přítomná již v GV-stádiu a hraje roli při znovuzahájení meiózy a výstavbě dělicího vřeténka, neboť mikroinjekce protilátky proti Aurora-A vede ke snížení schopnosti dosáhnout GVBD (germinal vesicle breakdown) a k deformaci vřeténka (Yao et al 2004). Další práce, publikovaná v posledním čísle Cell cycle, ukazuje, že aktivní Aurora-A lokalizuje těsně před GVBD na MTOCs (microtubule organizing centers), přičemž její aktivace není závislá na CDK1, ani na PI3K-PKB signalizaci (Saskova et al 2008). Mikroinjekce exogenní Aurora-A mRNA a její následná translace způsobuje amplifikaci MTOCs a výstavbu abnormálního MI vřeténka. Tato pozorování jednoznačně potvrzují funkci Aurory-A v meiotickém zrání.

Není dosud objasněno, zda Aurora-A v myších oocytech fosforyluje CDC25B, která by mohla být společným substrátem i pro CHK1. Pojítkem mezi Aurorou-A a CHK1 by mohla být protein kináza B (PKB). V mitotických buňkách PKB fosforyluje CHK1 na Ser280 a brání tak její aktivitě (King et al 2004). Zároveň je schopná inaktivovat GSK-3 (glycogen synthase kinase-3), která inhibuje Auroru-A (Wakefield et al 2003). Navíc také přímo fosforyluje CDC25B na Ser353, stejně jako Aurora-A (Baldin et al 2003). Tyto vlastnosti PKB nebyly v meióze dosud prokázány, nicméně výsledky recentních prací indikují, že PKB je zahrnuta v aktivaci CDK1 a znovuzahájení meiózy (Andersen et al 2003, Kalous et al 2006).

V myších oocytech je PKB aktivována fosforylací na Ser473 a Thr308 ještě před GVBD a to nezávisle na CDK1. Aktivní PKB je lokalizována na jaderné membráně a centrosomu (Kalous et al 2006). Zde se pravděpodobně setkává s CDC25B, jejíž fosforylace je, jak známo, nezbytná k aktivaci centrosomální CDK1. CDC25B

fosforylovaná na S353 se totiž v myších oocytech nachází na centrosomu těsně před GVBD (Šolc P., osobní sdělení). Je možné, že PKB působí aktivaci CDC25B také prostřednictvím inhibice CHK1. To by mohl být signál pro CHK1 k opuštění centrosomu před aktivací CDK1.

Jak již bylo popsáno ve čtvrté kapitole, CHK1 kináza reguluje také SAC, kontrolní bod zajišťovaný aktivitou MAD a BUB proteinů. Wassmann et al (2003) ukázali, že mitotický protein MAD2 je přítomen také v průběhu zrání myších oocytů a je rekrutován na kinetochory nepřipojených chromozomů. Navíc bylo zjištěno, že oocyty mad2^{+/-} myši mají problémy se segregací chromozomů a stejně jako vlivem overexprese MAD2 proteinu dochází k zastavení zrání v MI fázi nebo vzniku aneuploidií (Niault et al 2007). Přítomnost MAD2 proteinu na kinetochorech udržuje spindle checkpoint inhibicí APC/C ubiquitin ligázy (Reis et al 2007), která je v myších oocytech přítomná již v GV-stádiu (Reis et al 2006), kde se podílí na udržení oocytů v profázi I.

Pokud je CHK1 kináza aktivní v průběhu zrání oocytů, je pravděpodobné, že zastává jistou úlohu i v regulaci SAC. Zatím není zřejmé, zda také prostřednictvím Aurory-B nebo přímou interakcí s MAD a BUB proteiny. Možnou cestou by mohl být také protein CDC6, který je důležitým regulátorem replikace DNA a jeho deregulace vede k aktivaci CHK1. V myších oocytech je totiž nezbytný k formaci dělicího vřeténka (Anger et al 2005).

Ačkoliv zatím nebyla potvrzena aktivita CHK1 v meiotickém zrání savčích oocytů, její funkce zde je více než pravděpodobná.

MATERIÁL A METODY

Izolace, kultivace a mikroinjekce oocytů

Myší ovária byla získána z 3-4 týdenních samic (C57BL/6J X BALB/c) stimulovanými PMSG (*pregnant mare serum gonadotropin*). Ovária byla přenesena do média (*Earle salt bicarbonate-free*; E7510, Sigma) doplněného 3mg/ml PVA (*polyvinylalcohol*), 0.23mM pyruvátém a 25mM Hepesem (pH 7.3) a zahřátého na 37°C. Protože u savců dochází po vyjmutí oocytu z folikulu ke spontánnímu znovuzahájení meiózy, bylo médium obohaceno o 0.1mM inhibitor fosfodiesterázy PDE-3A IBMX (*3-isobutyl-1-methyl-xanthine*). Znovuzahájení meiózy a zrání oocytů bylo iniciováno odmytím IBMX a kultivací v čistém M-16 médiu (M7292, Sigma Aldrich) při 37.5°C ve vzduchu s příměsí 5% CO₂.

Pro inhibitorové studie byl použit SB218078 (559402, Calbiochem) inhibitor CHK1 při pracovní koncentraci 7.5μM. Oocyty byly nejprve preinkubovány v M-16 médiu obsahující inhibitor a 0.1mM IBMX po dobu jedné hodiny. Poté byly přeneseny do média s inhibitorem bez IBMX, kde byly dále kultivovány. Pro studium SAC byly použity cytostatika/mitotické drogy Paclitaxel neboli taxol (T1912, Sigma Aldrich) a Nocodazol (M1404, Sigma Aldrich), která narušují funkci mikrotubulů.

Oocyty byly mikroinjekovány 2-5pL roztoku RNA pomocí mikromanipulátoru MIS-5000 (Burleigh, Exfo Life Sciences) a mikroinjektoru PM 2000B4 (MicroData Instrument). Manipulační Whitten's médium bylo obohaceno 15mM Hepesem (pH 7.3) a 0.1mM IBMX. Pipety pro mikroinjekci byly vyrobeny pomocí p97 Pipette Puller (Sutter Instrument Company).

In vitro výroba mRNA a dsRNA

Vektor pCMV-SPORT6 obsahující myší Chk1 cDNA v plné délce (GenBank č.BC100386.1, MGC:117928, IMAGE:30481390) byl zakoupen od firmy imaGenes. Chk1 mRNA pro mikroinjekci byla vyrobena pomocí kitu mMMESSAGE mMACHINE® T3 Kit (#1348, Ambion) pro *in vitro* transkripci. Za účelem získání templátu pro transkripci byla Chk1 cDNA zaklonována do SpeI místa pBluescript-GFP vektoru obsahující T3-promotor a *Xenopus* globin 5'UTR, 3'UTR a Kozakovu sekvenci pro zajištění vysoké stability mRNA a účinné iniciace translace. Pro *in vitro* transkripci byl vektor linearizován pomocí

AscI. Ihned po *in vitro* transkripci byla mRNA polyadenylována pomocí kitu Poly(A) Tailing Kit (#AM1350, Ambion). Purifikace mRNA byla provedena pomocí RNeasy Mini Kit (#74104, Qiagen). Kontrolní Gfp mRNA byla transkribována z prázdného pBluescript-GFP vektoru.

dsRNA pro downregulaci Chk1 mRNA v myších oocytech byla vyrobena pomocí kitu MEGAscript® RNAi Kit (#AM1626, Ambion). Templát pro *in vitro* transkripci byl získán při PCR reakci. K tomu bylo nutné připojit na oba konce templátu sekvenci T7 promotoru, ze kterého se *in vitro* zahajuje transkripce RNA. Pro tento účel byly použity Chk1 specifické primery, které na 5'konci obsahovali sekvenci T7 promotoru: AGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGATTTGGGAGAAGGTGCCTATG a AGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGATGACAGCTATCACTGGGCTG. Pro kontrolní Gfp byly použity primery: AGGATCCTAATACGACTAACTATAGGGAGAA TGGTGAGCAAGGGCGAGGA a ACTCGAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGC GGCCGCTTTACTTGTACA. Primery byly navrženy tak, aby specificky zasahovali pouze jednu mRNA a zároveň byly minimalizovány *off-target* efekty. Délka použitých dsRNA fragmentů byla 606 bp pro Chk1 a 712 bp pro Gfp.

dsRNA i mRNA byly alikvotovány po 5 μ L při koncentraci 500ng RNA/ μ L RNase-free vody (AM9939, Ambion) a zamraženy v -80°C .

Western blotting

Oocyty určené pro western blotting byly po kultivaci na sucho zamraženy v -80°C . Před použitím pro SDS/PAGE elektroforézu byly vzorky oocytů lyzovány v 20 μ L SDS/PAGE vzorkovém pufru (62.5mM Tris/HCl, pH 6.8 při 25 $^{\circ}\text{C}$; 2% SDS; 10% glycerol; 0.01% bromfenolová modř a 5% 2-merkaptoetanol) povařením (100 $^{\circ}\text{C}$) po dobu 5 minut. Po frakcionaci SDS/PAGE elektroforézou byly proteiny přeneseny pomocí fast-blotu na PVDF membránu (Immobilon-P; Millipore). Membrána byla poté blokována po dobu 1 hodiny v T-TBS (Tris/HCl-buffered saline (pH 7.6) s 0.05% Tween 20) s 5% mlékem (Sigma). T-TBS bylo použito pro všechny další inkubace a oplachování.

Blokovaná membrána byla následně inkubována přes noc při 4 $^{\circ}\text{C}$ s CHK1-specifickou primární protilátkou (G-4, SC8408, Cell Signaling Technology, Inc.) v poměru 1:500 k T-TBS s 5% mlékem, resp. s (anti-phosphoChk1(S317), AF 2054, R&D Systems) v poměru 1:500 k T-TBS s 5% mlékem. Naznačená membrána byla poté oplachována (3 x 5 minut) a

dále inkubována při pokojové teplotě (18–25°C) se sekundární protilátkou HRP-goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) v poměru 1:7500 k T-TBS s 5% mlékem; resp. s HRP-goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) v poměru 1:7500. Následně byla membrána intenzivně oplachována (3-5 x 5 minut) a signál byl detekován pomocí ECL® (enhanced chemiluminiscence; Amersham).

Imunocytochemie

Oocyty se zonou pellucidou nebo zbavené zony pellucidy pomocí Tyrode pufru (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 0.5mM MgCl₂ · 6H₂O, 5mM D-glukóza a 4% polyvinylpyrrolidin, pH 2.5) nebo pronázy (0.002g/400μL PBS; Sigma) byly fixovány v 3.7% paraformaldehydu v PBS po 60 minut při pokojové teplotě. Poté byly promyty v PBS (4 x 15 minut) a vloženy do 50mM NH₄Cl v PBS s obsahem 0.3% BSA (PBS/BSA) kvůli blokování volných aldehydových skupin. Po oplachu v PBS/BSA (3 x 10 minut) byly oocyty 10 minut permeabilizovány v 0.5% Tritonu X-100 při pokojové teplotě. Následně byly jednu hodinu preinkubovány v 2% NGS (*normal goat serum*) v PBS/BSA. Po opětovném promytí (3 x 5 minut) se oocyty po určenou dobu inkubovaly s primární protilátkou naředěnou v PBS/BSA při 4°C.

Poté vždy následoval důkladný oplach (6-8 x 10 minut) v PBS/BSA a inkubace se sekundární protilátkou konjugovanou s fluorescenční barvičkou FITC (*fluorescein isothiocyanate*) nebo TexasRed minimálně po dobu 60 minut při pokojové teplotě (v případě experimentů s dvojitým primárním značením byly protilátky aplikovány současně, avšak odděleně byla provedena inkubace se sekundární protilátkou). Následně byly oocyty opět důkladně promyty (6-8 x 10 minut). Ke značení DNA byl použit Hoechst 33258 (1mg/mL) nebo DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*). Uchycení vzorku oocytů na podložním skle bylo provedeno pomocí roztoku Mowiol (475904, Calbiochem).

Pro vizualizaci mikrotubulů byla použita myší monoklonální protilátka proti acetylovanému α -tubulinu (T7451, Sigma Aldrich). Diferenciace kortikální membrány byla pozorována pomocí concanavalinu A (C11252, Invitrogen). MTOC centra a byly značeny pomocí protilátky proti γ -tubulinu (NB120-11320, Novus Biologicals, Inc.).

Histon H1/CDK1 kinázová assay

Aktivita CDK1 kinázy v extraktech oocytů byla měřena její schopností fosforylovat externí substrát histon H1. 10 oocytů z různých stádií zrání či z kultivace s inhibitory byly lyzovány v 5 μ l lyzačního pufru (2x konc.ExA). Pro dokonalou lýzu bylo vzorky nutno 3x zmrazit (-80) a na ledu rozmrazit. Kinázová reakce byla spuštěna přidáním 5 μ l kinázového mixu s histonem H1 a radioaktivním [γ -³²P] ATP k lyzovaným oocytům. Reakce probíhala přesně 30 min v 37 °C. Poté byla zastavena přidáním 10 μ l 2x konc.vzorkového SDS Laemmli pufru a vzorky byly 3 min povařeny a aplikovány na 15 % SDS/PAGE gel. Po rozdělení byl gel obarven Coomassie Blue R250, odbarven a usušen na sušičce. Autoradiografie byla provedena ve speciální kazetě s intenzifikační podložkou, na obarvený gel byl umístěn radiosenzitivní film (Kodak, X-Omat AR), který byl exponován v -80 °C 2-5 dní, a poté byl vyvolán. Autaradiogramy byly analyzovány pomocí programu Scion Image Software.

Analýza a zpracování dat

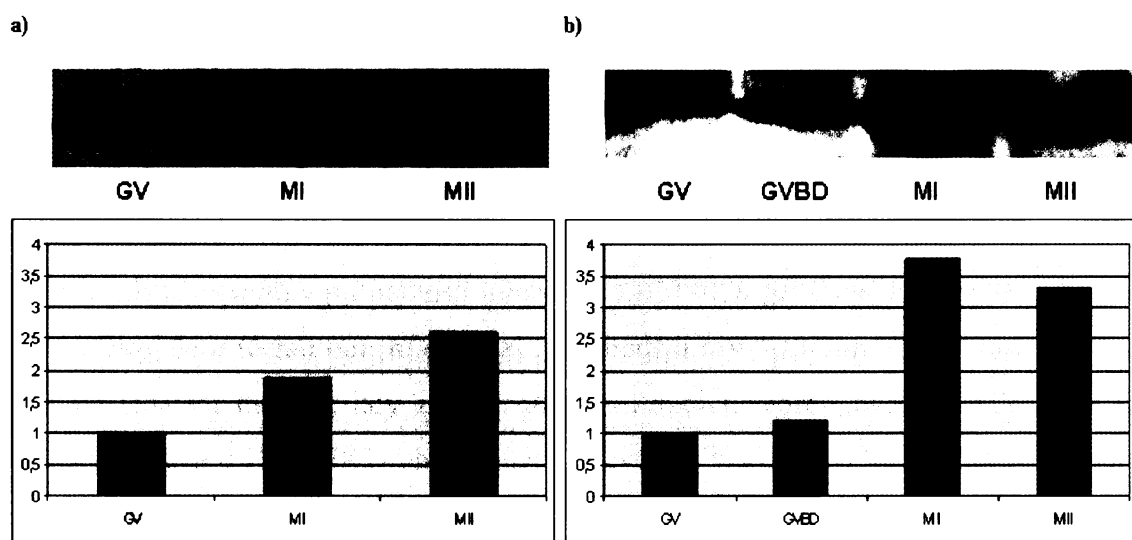
Snímky preparátů byly pořízeny na konfokálním skenovacím mikroskopu Leica TCS SP (Leica Microsystems AG). Živé oocyty byly pozorovány a snímány na invertovaném mikroskopu Olympus IX70 vybaveným CCD kamerou. Editace snímků byla provedena pomocí softwaru Adobe Photoshop a Leica Confocal Software, LCS lite 2.61 (Leica Microsystems). Statistická analýza dat byla provedena v programu NCSS 2001.

VÝSLEDKY

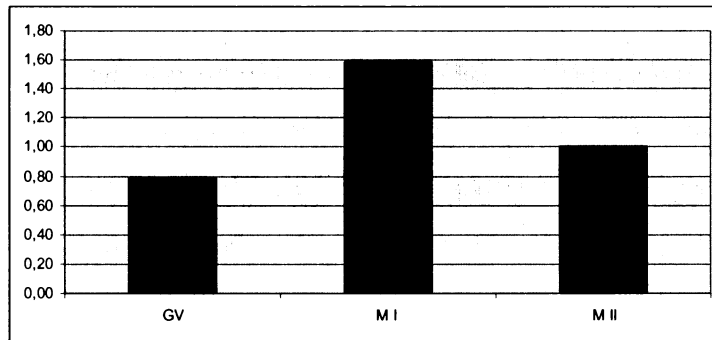
Expres a fosforylace CHK1

U somatických buněk je CHK1 během neovlivněného buněčného cyklu exprimována stabilně během S a G₂ – fáze a její aktivita pravděpodobně není závislá na fosforylaci, ke které dochází až vlivem případného poškození DNA a aktivace kontrolního bodu (Bartek & Lukas 2003). V oocytech byla přítomnost CHK1 popsána jen u modelu *Xenopus*, kde je exprimována konstatně v průběhu zrání (Nakajo et al 1999). U savců nebyla doposud oocytární CHK1 popsána.

První výsledek této práce ukazuje, že v myších oocytech je checkpoint kináza 1 přítomná a její expres na úrovni proteinu stoupá v průběhu meiotického zrání (Obr.8a). Již v GV-stádiu je detekovatelná nízká hladina CHK1 proteinu, která dosahuje maxima v MII fázi. Fosforylace CHK1 na Ser317 neroste úměrně s množstvím proteinu, ale k masivní fosforylaci dochází v MI a MII fázi (Obr.8b). To znamená, že aktivita CHK1 v oocytech není závislá pouze na expresi proteinu, ale je regulována také některou komponentou CHK1-aktivující signální dráhy (pravděpodobně ATM). Nárůst fosforylace CHK1 nezávisle na expresi proteinu v průběhu meiotického zrání je znázorněn na obrázku 9 (Obr.9).



Obrázek 8: Expres CHK1 proteinu a jeho fosforylace během meiotického zrání. a) Detekce celkového CHK1 proteinu a b) detekce fosfo-Ser317 formy CHK1 proteinu v různých fázích zrání metodou Western blotting s následnou kvantifikací signálu. GV-intaktní oocyty, GVBD(germinal vesicle break-down)- 60 min., MI-7 hod. a MII-18 hod. Vzorky jednotlivých fází obsahovaly po 400 oocytech. Specifita protilátek byla ověřena na vzorcích HeLa a NIH3T3 buněk (data nezobrazena).



Obrázek 9: Nárůst fosforylace CHK1 nezávisle na expresi proteinu. Hodnoty vyjádřeny jako podíl absolutních hodnot pro fosfo-Ser317 a celkový CHK1 protein.

Určitá hladina fosfo-Ser317 CHK1 proteinu je přítomná v oocytech již v GV-stádiu a mohla by představovat míru bazální aktivity CHK1. To by znamenalo, že CHK1 kináza může být, podobně jako v mitóze, zahrnuta v signálních drahách regulujících aktivaci CDK1/cyklin B komplexu a znovuzahájení meiózy.

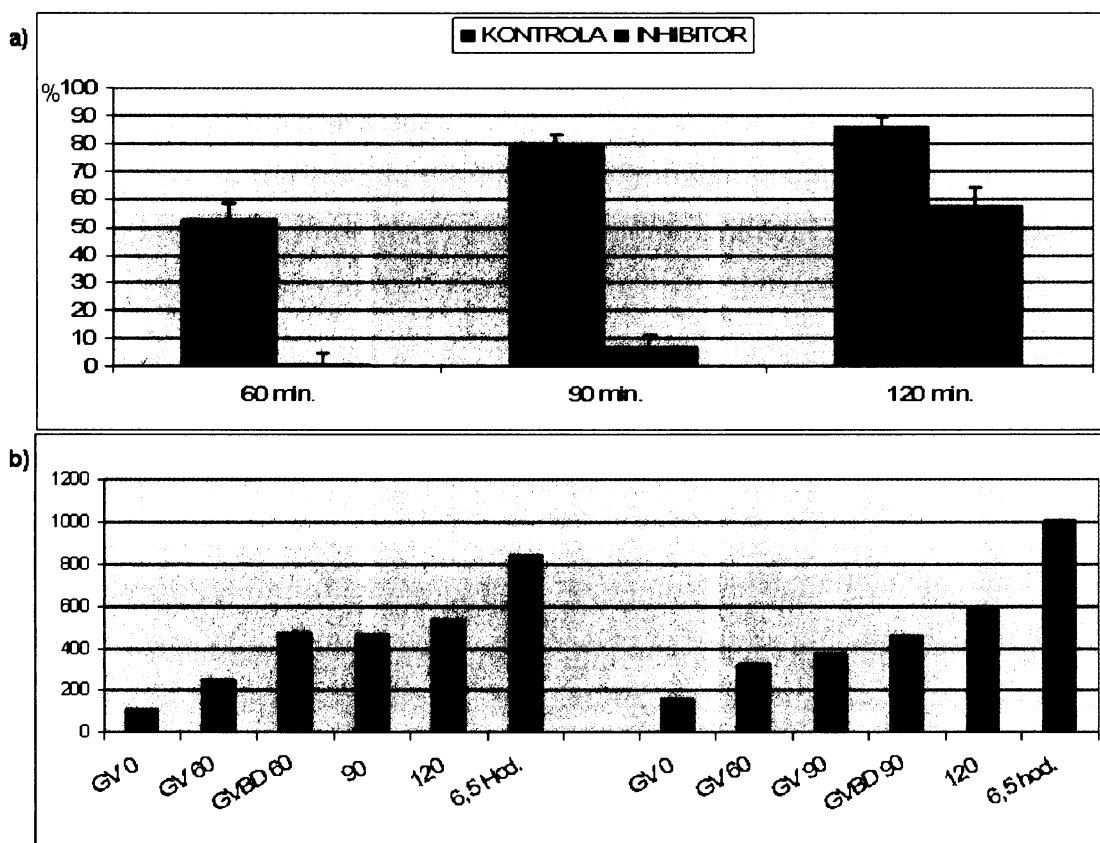
Chemická inhibice CHK1

Pro studium funkce CHK1 v meiotickém zrání myších oocytů byl nejprve zvolen farmakologický přístup s použitím CHK1 inhibitoru SB218078 od firmy Calbiochem. Tento analog staurosporinu je běžně užíván k umělému narušení G_2/M – kontrolního bodu (jehož je CHK1 klíčovou molekulou) u nádorových buněčných linií, často také v kombinaci s inhibitory topoizomerázy I (Deckbar et al 2007, Jackson et al 2000). SB218078 sám o sobě nezpůsobuje zlomy v DNA. Jde o ATP-kompetitivní inhibitor, který se váže do ATP-vazebného místa CHK1, přičemž tato vazba nezpůsobuje větší změny v konformaci CHK1 proteinu (Zhao et al 2002).

Při kultivaci oocytů v přítomnosti inhibitoru SB218078 (pracovní koncentrace 7.5 μM) vyšlo najevo, že u těchto oocytů dochází ke zpoždění GVBD (Obr.10a). V čase 60 minut po znovuzahájení meiózy, kdy zhruba 50% kontrolních/neošetřených oocytů již prošlo GVBD, je pouze 0.7% CHK1-inhibovaných oocytů po GVBD. Po 90 minutách průměrně 79% kontrolních oocytů prošlo GVBD, zatímco pouze 6.5% z CHK1-inhibovaných. V čase 120 minut po zahájení zrání již průměrně 57.5% oocytů ošetřených inhibitorem prošlo GVBD, naproti tomu v kontrole 86%.

Protože se zdálo, že zpoždění GVBD je důsledek interakce inhibitoru a CDK1 (tedy nespecifity inhibitoru) byly nasbírány vzorky oocytů v jednotlivých intervalech a

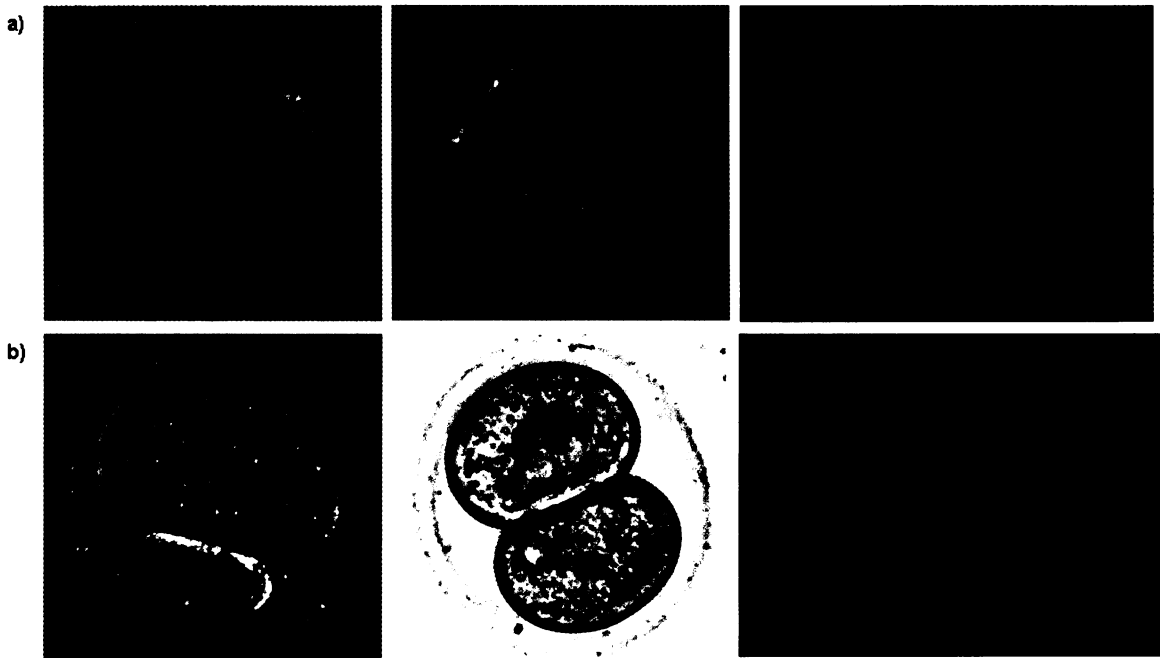
provedena CDK1 kinázová assay (Obr.10b). Ukázalo se, že aktivita CDK1 kinázy je v oocytech ošetřených CHK1 inhibitorem skutečně nižší, než u kontrolních oocytů. Tento pokles je pozorovatelný v rozmezí 60–120 minut po znovuzahájení meiózy. U kontrolních oocytů v čase 60 minut po odmytí IBMX již CDK1 aktivita dosáhla prahové úrovně a u těchto oocytů došlo k GVBD (v grafu jako “GVBD 60“). Avšak u CHK1-inhibovaných oocytů, podobně jako u zbylých 50% kontrolních, CDK1 aktivita této úrovně nedosáhla a k GVBD u 99% z nich nedošlo (v grafu jako “GV 60“). Po 90 minutách již u většiny (79%) kontrolních oocytů dosáhla aktivita CDK1 úrovně GVBD (v grafu jako “90“), zatímco u CHK1-inhibovaných oocytů (v grafu jako “GVBD 90“) k tomu došlo teprve u 6.5% a jejich CDK1 aktivita je srovnatelná s kontrolními oocyty po GVBD v čase 60 minut. U zbylých 93.5% CHK1-inhibovaných oocytů je CDK1 aktivita stále pod prahovou úrovní (v grafu jako “GV 90“).



Obrázek 10: Zpoždění GVBD po inhibici CHK1. a) Procentuální zastoupení kontrolních a inhibitorem SB218078 ošetřených oocytů po GVBD v čase 60, 90 a 120 minut po zahájení zrání. Míra variability ve skupinách je znázorněna pomocí intervalů spolehlivosti ($p < 0.05$). b) CDK1 kinázová aktivita kontrolních a inhibitorem SB218078 ošetřených oocytů. GV 0-intaktní oocyty, GV 60 resp. GV 90-oocyty v GV-stádiu 60 resp. 90min. po zahájení zrání, GVBD 60 resp. GVBD 90-oocyty po GVBD v čase 60 resp. 90min. po zahájení zrání, 120-oocyty po GVBD v čase 120min., 6.5hod.-oocyty po GVBD v čase 6.5hod. po zahájení zrání.

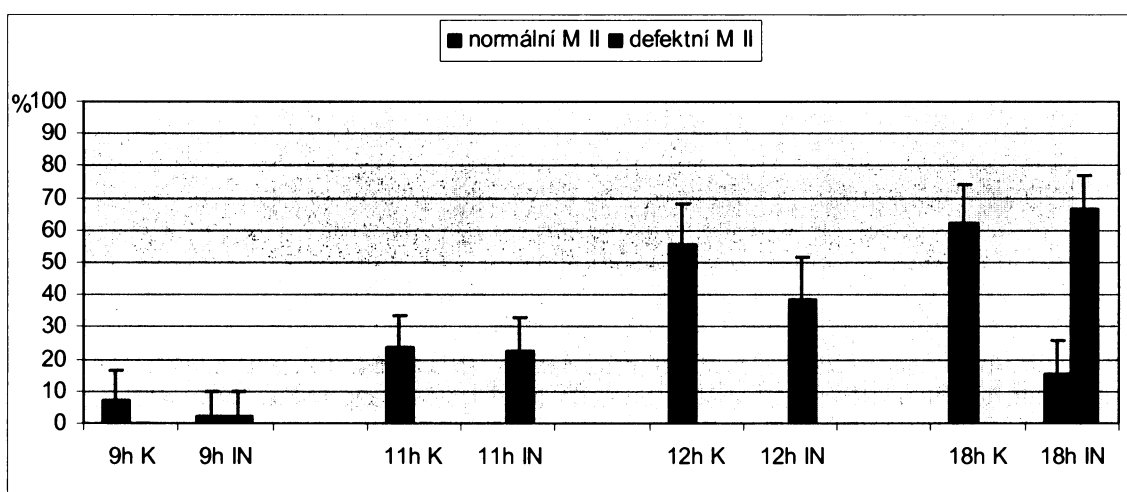
Zpoždění GVBD u CHK1- inhibovaných oocytů tedy činí asi 60 minut oproti kontrolním, neboť teprve po 120 minutách zrání dosáhne průměrně 57.5% GVBD, což u kontrolních oocytů odpovídá situaci v čase 60 minut. Masivní nárůst CDK1 kinázové aktivity po 120 minutách zrání není způsoben zvýšenou fosforylací CDK1, ale expresí nových CDK1/cyklin B molekul vlivem zahájení proteosyntézy v oocytu.

U oocytů kultivovaných v přítomnosti CHK1 inhibitoru byly v pozdějších fázích zrání identifikovány mnohé abnormality a defekty v morfologii, svědčící o negativním vlivu inhibice CHK1 na meiotické zrání. CHK1-inhibované oocyty vydělují abnormálně velká pólová tělíska (PB, z angl. polar body) a u některých oocytů je dokonce patrné, že vydělení PB neproběhlo asymetricky, jak k tomu dochází u kontrolních oocytů, ale téměř symetricky, takže to vypadá, jakoby se oocyt “štípnul“ napůl (Obr.11). Tento fenotyp vypadá velmi podobně jako aktivace oocytu, ke které dochází po oplození, kdy je zahájeno rýhování vajíčka. Z toho důvodu bylo také ověřeno, zda inhibitor SB21078 nemá vliv na CSF (cytostatický faktor), který reguluje aktivaci vajíčka. Tato hypotéza se však nepotvrdila, neboť oocyty se dále nerýhovaly, naopak takto symetricky rozdělené oocyty v kultivaci umíraly (data neukázána).



Obrázek 11: Defekty v morfologii oocytů ošetřených inhibitorem SB218078. a) Reprezentativní vzorky kontrolních oocytů s normální morfologií. b) Reprezentativní vzorky inhibovaných oocytů s defektním vydělením PB. Snímky v prvním a druhém sloupci foceny ve viditelném světle, snímky ve třetím sloupci zobrazují oocyty po imunocytochemickém značení acetylovaného α -tubulinu (červeně), zviditelňující dělicí vřeténko, a DNA (modře).

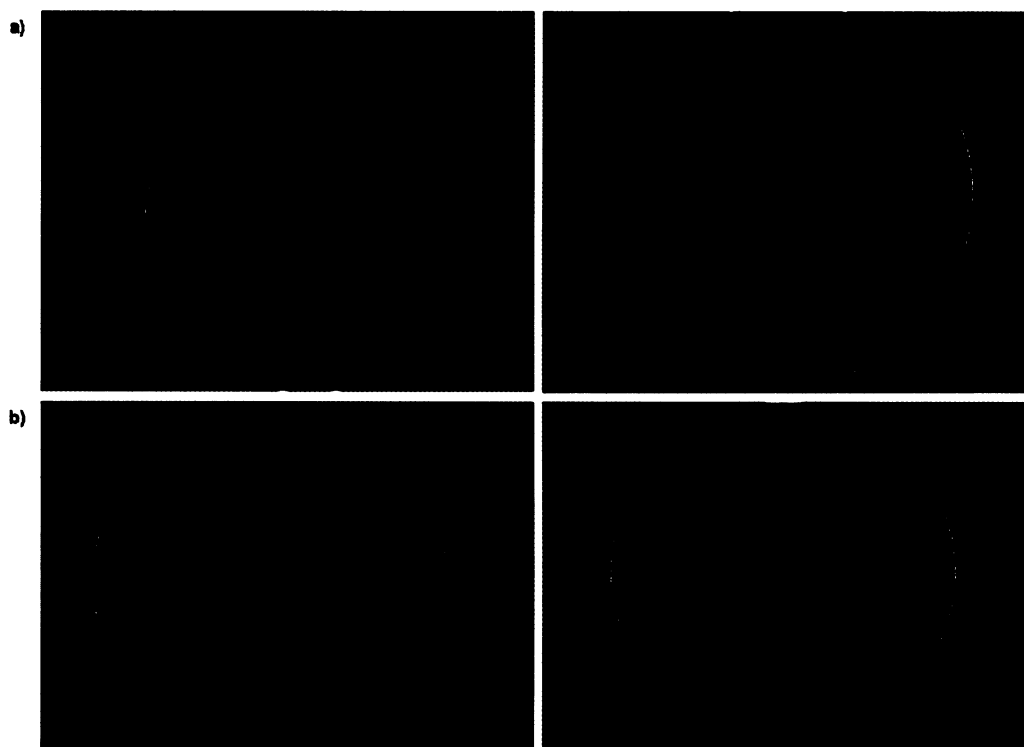
Podrobným sledováním průběhu meiotického zrání vyšlo najevo, že kontrolní i CHK1-inhibované oocyty mají podobnou dynamiku vydělování pólových tělísek (obě skupiny vydělují srovnatelné počty PB v čase), avšak téměř každý CHK1-inhibovaný oocyt, který vydělil PB, byl defektní (tzn. vydělilo se buď abnormálně velké PB nebo se oocyt rozdělil symetricky)(Obr.12). Navíc po osmnácti hodinách kultivace vydělí pólové tělísko (defektní nebo normální) asi 82% CHK1-inhibovaných oocytů, což je o 20% více než se průměrně objeví v kontrolní skupině oocytů. Tento jev je způsoben pravděpodobně narušením některých kontrolních bodů oocytu, který pak dojde až do MII fáze, ačkoliv za normálních okolností by byl ve svém zrání zastaven.



Obrázek 12: Dynamika vydělování pólového tělíska (PB). Procentuální zastoupení oocytů s normálním PB (normální MII) nebo se zvětšeným PB či symetricky vyděleným PB (defektní MII) v kontrolní skupině (K) a ve skupině oocytů ošetřených CHK1 inhibítorem (IN) stanoveny na základě pozorování v intervalech 9, 11, 12, 15 a 18 hodin po zahájení zrání. Míra variability ve skupinách je znázorněna pomocí intervalů spolehlivosti ($p < 0.05$).

Tato vnější pozorování samozřejmě odráží děje, ke kterým dochází, v důsledku inhibice CHK1, uvnitř buňky. Z toho důvodu bylo další úsilí věnováno pozorování stavu cytoskeletu, především v čase mezi metafází I a metafází II.

Struktura dělicího vřeténka není inhibicí CHK1 výrazně narušena, avšak rozdíl mezi kontrolními a CHK1-inhibovanými oocyty je v poloze dělicího vřeténka (Obr.13). Přibližně v MI-fázi (6.5 hod.), když jsou již všechny chromozomy seřazeny v metafázní rovině uprostřed oocytu, začíná dělicí vřeténko migrovat směrem ke kortexu (sít' aktinových filament pod plasmatickou membránou oocytu). Tak tomu také je u kontrolních oocytů, které po sedmi hodinách zrání mají již ze 70% namigrované dělicí vřeténko u kortexu.

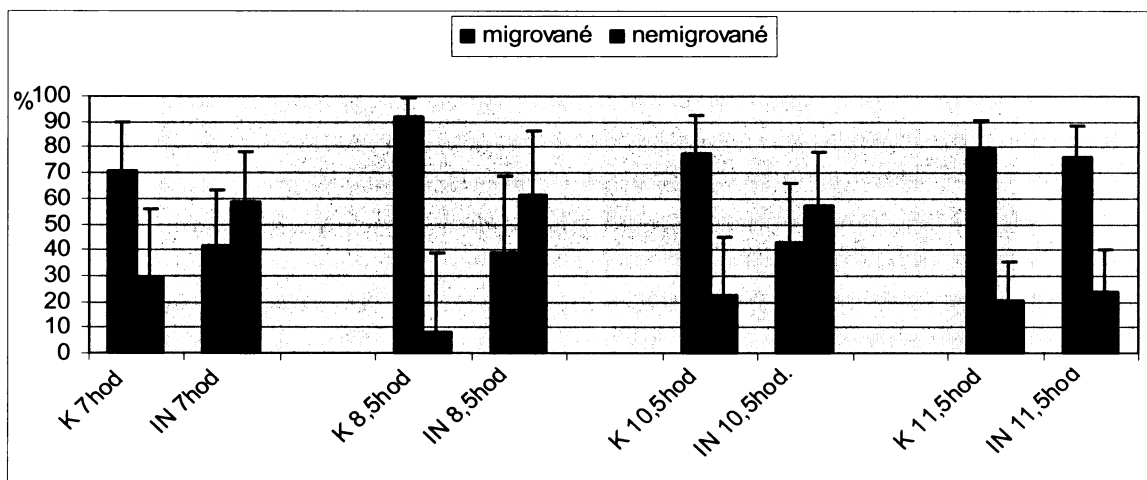


Obrázek 13: Poloha dělicího vřeténka a) v kontrolních oocytech b) v oocytech ošetřených CHK1 inhibitorem v čase 10.5 hodiny po zahájení zrání. Červeně acetylovaný α -tubulin značící mikrotubuly dělicího vřeténka, zeleně γ -tubulin značící MTOC centra, modře DAPI značící DNA. Plasmatická membrána oocytu zvýrazněna žlutou linkou.

U 60% CHK1-inhibovaných oocytů však dělicí vřeténko zůstává uprostřed oocytu a nemigruje ke kortexu ještě v čase 10.5 hodiny po zahájení zrání. Až kolem 11.5 hodin dělicí vřeténko migrovalo i u většiny CHK1-inhibovaných oocytů, ty se již významně neliší od kontroly (Obr.14).

Podle těchto výsledků způsobuje inhibice CHK1 zpomalení nebo dočasné zpoždění migrace vřeténka, která by mohla být důvodem symetrického dělení CHK1-inhibovaných oocytů zobrazených na obrázku 11. Pozice dělicího vřeténka totiž určuje, kde se membrána oocytu začne zaškrcovat a vydělovat PB, neboli kde proběhne cytokineze. Jestliže vřeténko vlivem inhibice CHK1 zůstává někde uprostřed oocytu, ten se začne zaškrcovat nikoliv na periférii, ale v polovině. Vydělení PB poté není asymetrické ale symetrické. Jedná se tedy o defektní cytokinezi.

Z těchto pozorování vyplývá, že CHK1 kináza má vliv na migraci dělicího vřeténka a pravděpodobně hraje roli v určení jeho správné pozice v myších oocytech.

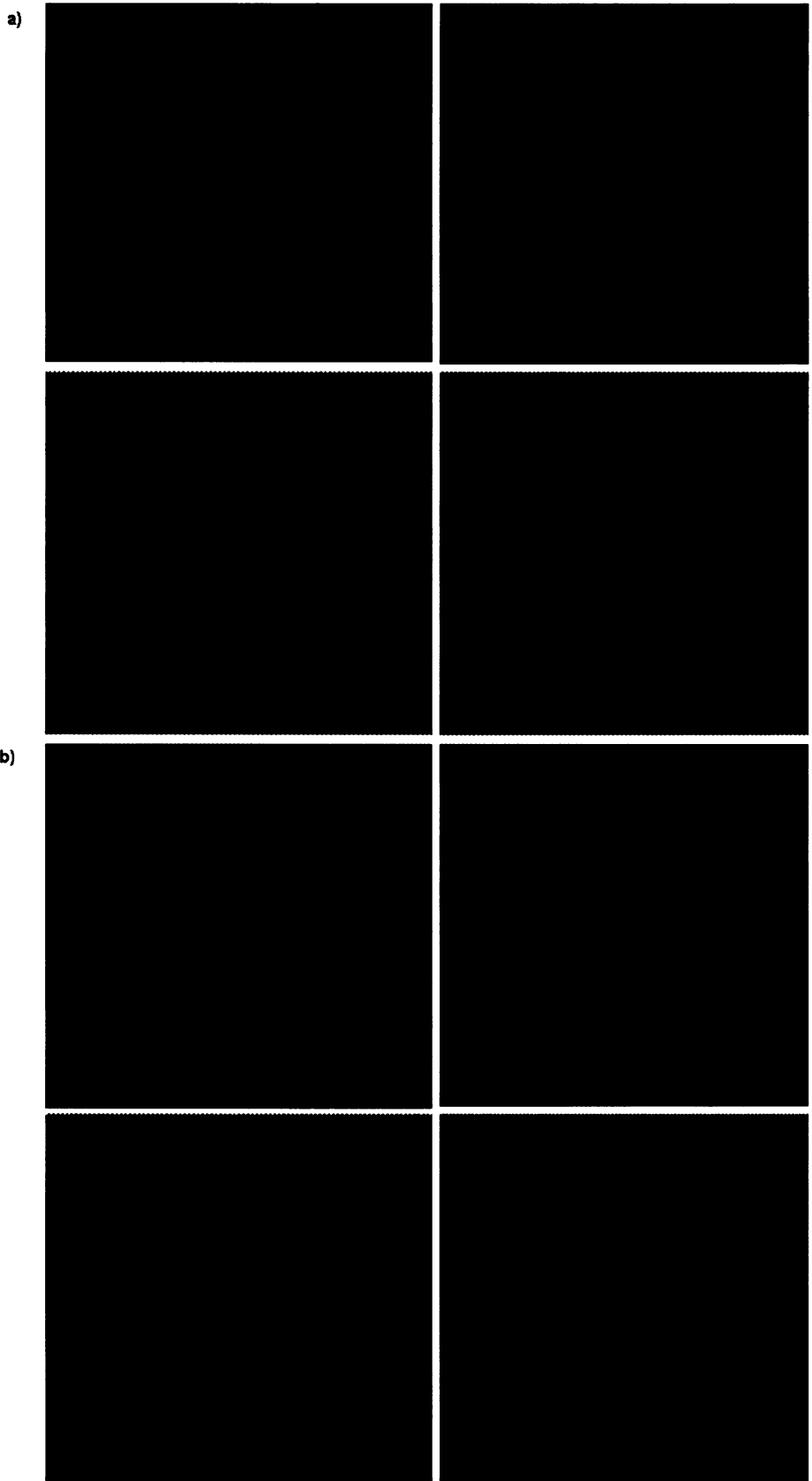


Obrázek 14: Migrace dělicího vřeténka v čase. Procentuální zastoupení kontrolních (K) a CHK1-inhibovaných (IN) oocytů s migrovaným nebo nemigrovaným dělicím vřeténkem v intervalech 7, 8.5, 10.5 a 11.5 hodin. Míra variability ve skupinách je znázorněna pomocí intervalů spolehlivosti. Jejich velký rozptyl je dán malými počty oocytů v experimentu (p-hodnota v čase 7 hod. byla větší než 0.05).

Za fyziologických podmínek dochází v myších oocytech vlivem migrace dělicího vřeténka k diferenciaci kortikální membrány (změny kortexu a plasmatické membrány). V místě, kde se chromozomy přiblíží ke kortexu, se zvýší množství aktinových filament a z povrchu plasmatické membrány vymizí mikroklky, které jinak pokrývají téměř celý povrch oocyty. Pokud inhibice CHK1 negativně působí na migraci dělicího vřeténka, je pravděpodobné, že ovlivní také diferenciaci kortikální membrány.

Distribuce mikroklků byla proto sledována pomocí concanavalinu A. Tento peptid příbuzný lektinu se specificky váže na zbytky glykoproteinů na povrchu mikroklků. Je tedy navázán pouze tam, kde jsou mikroklky přítomné. V kontrolních oocytech po devíti hodinách zrání se dělicí vřeténko nachází u kortexu a v blízkosti chromozomů je jasně vidět diferenciaci kortikální membrány (Obr.15a). Mikroklky vymizí přibližně na čtvrtině povrchu oocyty, kde se následně bude vydělovat pólové tělísko. Ve stejném čase u většiny oocytů ošetřených CHK1 inhibítorem stále nedošlo k migraci dělicího vřeténka ke kortexu, nachází se zhruba uprostřed oocyty. Kvůli tomu nejspíše také nedošlo k diferenciaci kortikální membrány. Nicméně část CHK1-inhibovaných oocytů má vřeténko namigrované, ale zde překvapivě k diferenciaci také nedošlo (Obr.15b). Na celém povrchu těchto oocytů zůstávají přítomné mikroklky, nevymizí ani z blízkosti chromozomů.

Diferenciaci kortikální membrány pozorována průměrně u 75% kontrolních oocytů, ale pouze u 7.5% CHK1-inhibovaných oocytů. Zatím není zřejmé, zda absence diferenciaci je způsobena v důsledku zpožděné migrace dělicího vřeténka nebo v důsledku inhibice CHK1 podílející se na signalizaci indukující diferenciaci kortikální membrány oocyty.

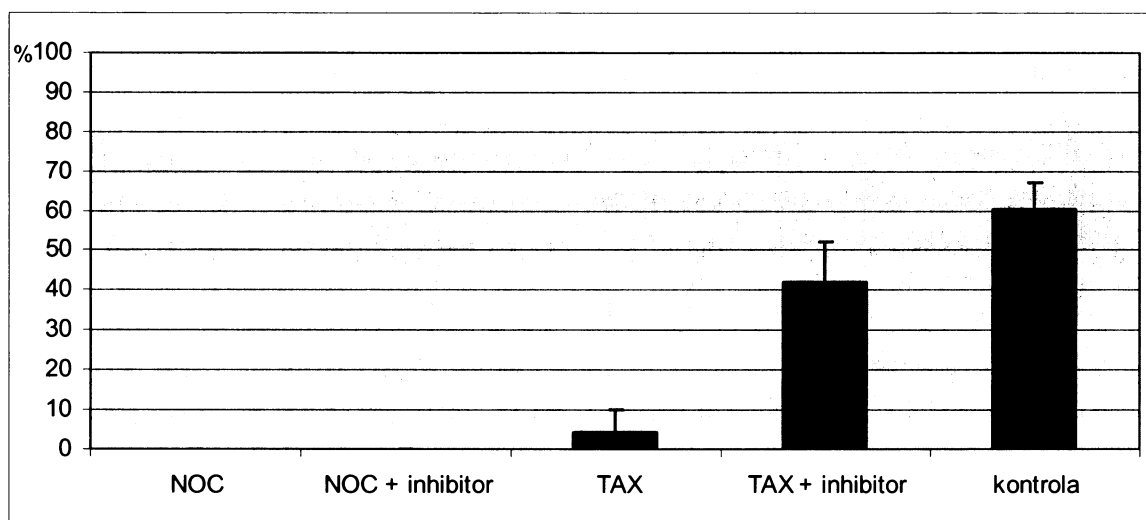


Obrázek 15: Diferenciace kortikální membrány. a) Kontrolní a b) CHK1-inhibované oocyty fixované po 9 hodinách zrání byly značeny concanavalinem A (zeleně), protilátkou proti α -tubulinu (červeně) a DAPI (modře). V levém sloupci zobrazeny vybrané řezy oocytů, v pravém 3D-rekonstrukce oocytů ze všech řezů.

Mezi další abnormality oocytů ošetřených inhibitorem CHK1 kinázy lze zařadit také mislokalizace chromatinu, ke kterým docházelo zejména mezi MI a MII fází (data nezobrazena). CHK1-inhibované oocyty vstupují do anafáze, i když ještě nejsou všechny chromozomy seřazené v metafázní rovině. Nicméně i přes takto vzniklé chyby v segregaci chromozomů jsou tyto oocyty schopné dojít do MII fáze. Z těchto pozorování bylo usouzeno, že oocyty kultivované v CHK1 inhibitoru jsou nejspíše schopné částečně překonat spindle assembly checkpoint. Také u somatických buněk je CHK1 nezbytná pro korektní funkci SAC (Zachos et al 2007).

Pro ověření této hypotézy byl u oocytů uměle aktivován SAC přidáním nocodazolu nebo taxolu do kultivačního média po pěti hodinách zrání. Tyto látky narušují strukturu dělicího vřeténka, bez kterého nemůže dojít ke korektní segregaci chromozomů, takže normální oocyty aktivují SAC a zastaví meiotické zrání. Tak se také zachovaly oocyty kultivované pouze v přítomnosti nocodazolu i většina oocytů kultivovaných v přítomnosti taxolu, ačkoliv zde se již objevilo pár oocytů (4.5%), které došly do MII fáze. Tento jev může být vysvětlen odlišným účinkem nocodazolu a taxolu. Nocodazol působí úplnou depolymeraci mikrotubulů dělicího vřeténka, zatímco taxol stabilizuje mikrotubuly, čímž brání jejich přirozenému dynamickému pohybu. Takový dopad na cytoskelet oocytu je pravděpodobně jemnější než účinek nocodazolu.

Podle předpokladu hypotézy překonalo (došlo do MII fáze) významné procento (42%) oocytů, kultivovaných v přítomnosti CHK1 inhibitoru, SAC kontrolní bod aktivovaný taxolem (Obr.16).



Obrázek 16: Inhibice CHK1 překoná aktivovaný SAC. Procentuální zastoupení oocytů, kultivovaných v různých podmínkách, které došly do MII fáze. Cytostatika nocodazol (NOC) a taxol (TAX) použity v 7.5 μ M koncentraci. Míra variability ve skupinách je znázorněna pomocí intervalů spolehlivosti ($p < 0.05$).

Žádný oocyt však nepřekonal SAC aktivovaný nocodazolem, což podporuje tvrzení o odlišném účinku obou drog. Nocodazol účinně zabrání dalšímu zrání u 100% oocytů, třebaže mají inhibovanou CHK1 kinázu. Toto razantní zastavení zrání vlivem nocodazolu je v oocytu zjevně zajištěno signálními drahami, které efektivně fungují i bez účasti CHK1. Účinek taxolu však očividně není tak akutní, aby aktivoval tyto signální dráhy. Jakoby buňka odpovídala na poškození do určité míry jedním způsobem (vliv taxolu – signalizace zahrnující CHK1) a na poškození nad tuto míru druhým způsobem (vliv nocodazolu – signalizace bez účasti CHK1). Inhibice CHK1 pak v přítomnosti taxolu umožní téměř polovině oocytů vstoupit do anafáze i s nepřipojenými chromozomy v důsledku narušené struktury dělicího vřeténka.

CHK1 tedy v myších oocytech hraje roli také v SAC. Zatím však není známo, zda se podobně jako u somatických buněk také lokalizuje na kinetochory, a zda i v oocytech přímo fosforyluje Auroru-B.

Downregulace CHK1 pomocí RNAi

Při použití farmakologického inhibitoru vždy vyvstává otázka o skutečné specifitě k inhibované látce. Je totiž možné, že z několika set různých kináz kódovaných savčím genomem, inhibitor nezasahuje pouze jednu kinázu, ale i některé další. Proto je vhodné ověřit inhibici CHK1 a jí způsobené fenotypy ještě jinou nezávislou metodou. Na základě poznatku o nárůstu CHK1 proteinu, který je závislý na přítomnosti Chk1 mRNA, se jeví jako nejvhodnější metoda RNA interference (RNAi). Specifická dsRNA, mikroinjekovaná do oocytů, vyvolá pokles hladiny Chk1 mRNA a tím znemožní expresi dalšího CHK1 proteinu.

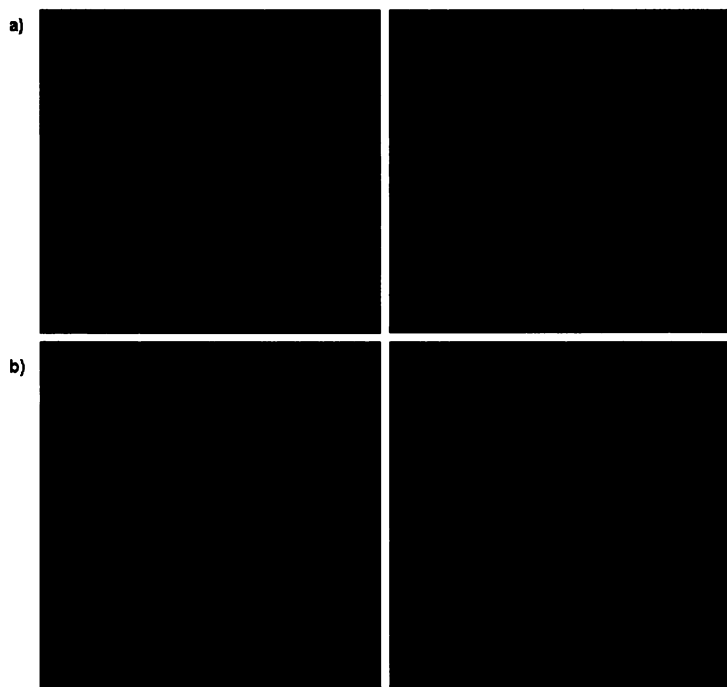
In vitro připravená dsRNA (606bp) byla mikroinjekována v koncentraci 250ng/μL do oocytů v GV-stádiu za přítomnosti IBMX pro inhibici zrání. Kontrolní oocyty byly mikroinjekovány GFP (green fluorescent protein). Poté byly oocyty ponechány 24 hodin v kultivaci (stále s IBMX), aby mohlo dojít k efektivní downregulaci Chk1 mRNA. Účinnost fungování RNAi (deplece Chk1 mRNA) byla verifikována pomocí real-time qPCR kvantifikace Chk1 mRNA (data neukázána). Po 24 hodinách bylo odmyto IBMX a tím umožněno meiotické zrání. Prvním fenotypem inhibice CHK1 bylo zpoždění GVBD, které však v tomto experimentu nebylo možno sledovat, protože mikroinjekované oocyty mají nesynchronizované zrání a každý z nich dosáhne GVBD v různém čase.

Dynamika vydělování pólového tělíska byla pozorována jak u CHK1-depletovaných, tak u GFP-mikroinjekovaných oocytů. Na rozdíl od inhibice CHK1 ale nebyly pozorovány odlišnosti v počtu vydělených PB mezi těmito oocyty. Symetricky rozdělené oocyty sice byly ve skupině CHK1-depletovaných oocytů zaznamenány, nicméně se objevily také u GFP-mikroinjekovaných oocytů a dokonce i v kontrolní skupině nemikroinjekovaných oocytů. Evidentně tedy nelze tento fenotyp připisovat vlivu deplece CHK1. Spíše byl způsoben 24 hodinovým pobytem v IBMX, které má po tak dlouhé kultivaci pravděpodobně toxický účinek. Přispět k tomu může také vliv mikroinjekce, která sama o sobě není pro oocyty “příjemná”.

Pozoruhodné je, že ani na migraci dělicího vřeténka a diferenciaci kortikální membrány neměla deplece CHK1 pomocí RNAi významný vliv. Mezi CHK1-depletovanými a GFP-mikroinjekovanými oocyty nebyly z hlediska těchto dvou dějů zřetelné rozdíly, respektive ani u GFP-mikroinjekovaných oocytů nebyla vidět přesvědčivá migrace a diferenciace.

Stejně tak spindle assembly checkpoint indukovaný taxolem nebyl u CHK1-depletovaných oocytů překonán, žádný z nich nedosáhl MII fáze.

Efekt downregulace CHK1 v oocytech se projevil hlavně na dělicím vřeténku (Obr.17).



Obrázek 17: Efekt downregulace CHK1 v myších oocytech. Dělicí vřeténka a) GFP-mikroinjekovaných a b) CHK1-depletovaných oocytů po 7 hodinách zrání. Červeně značený α -tubulin, modře DNA.

Zatímco GFP-mikroinjekované oocyty měly dělicí vřeténka normální (Obr.17a), struktura, a tím i funkce dělicího vřeténka u CHK1-depletovaných oocytů byla výrazně narušena. Seřazení chromozomů v metafázi rovině selhalo nebo proběhlo jen částečně, očividné byly problémy s napojením mikrotubulů na kinetochory chromozomů, v důsledku čehož také došlo k chybné segregaci (Obr.17b). Tyto abnormality se objevily až u 50% oocytů s downregulovanou CHK1. Některá dělicí vřeténka těchto oocytů navíc měla tendenci k multipolaritě.

Tyto výsledky ukazují, že fenotypy inhibice a deplece CHK1 v myších oocytech jsou velmi rozdílné. Příčinou je nejspíše odlišný způsob účinku obou metod, který bude probrán v kapitole Diskuze.

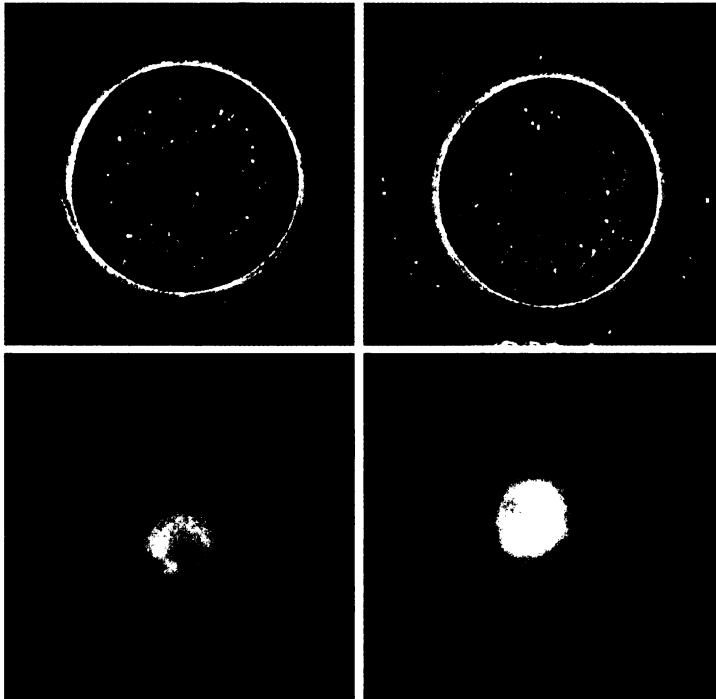
Over-exprese CHK1

CHK1 je v oocytech přítomná již v GV-stádiu a hraje určitou roli při znovuzahájení meiózy. Proto je velmi pravděpodobné, že několikanásobný nárůst CHK1 proteinu nad její fyziologickou hladinu ovlivní zahájení zrání. K tomuto účelu byla zvolena metoda over-exprese CHK1 mRNA.

Oocyty v GV-stádiu byly mikroinjekovány GFP-CHK1 mRNA (koncentrace 150ng/ μ L) a následně 90 minut kultivovány v přítomnosti IBMX za účelem poskytnutí času na expresi CHK1 proteinu. Ve chvíli, kdy byl GFP-signál již detekovatelný (došlo k expresi CHK1 proteinu) byly oocyty přeneseny do média bez IBMX a dále kultivovány po dobu 18 hodin.

Při pozorování bylo zjištěno, že 100% oocytů, které byly efektivně mikroinjekovány (vykazovaly pozitivní GFP-signál), zůstalo i po osmnácti hodinách zrání v GV-stádiu. Jaderná membrána zůstala intaktní a CHK1 lokalizovala především do jádra, nicméně určité malé množství proteinu lokalizuje také v cytoplasmě (Obr.18).

Over-exprese CHK1 tedy v myších oocytech způsobuje GV-blok, který je, zdá se, permanentní. Tato zjištění svědčí o tom, jak důležité je udržení správné hladiny CHK1 kinázy pro meiotické zrání. Na molekulární úrovni zatím není jasné, jak CHK1 v oocytech funguje, které molekuly reguluje, a kterými je sama regulována. Podle dosažených výsledků a recentních dat však lze usuzovat na vztah mezi CHK1 a CDC25A fosfatázou, který bude diskutován v následující kapitole.



Obrázek 18: Lokalizace CHK1 v živých oocytech po mikroinjekci GFP-Chk1 mRNA. V první řadě snímky oocytů ve viditelném světle, ve druhé řadě fluorescenční snímky GFP-CHK1 signálu.

DISKUZE

Stále více prací v současné době potvrzuje, že checkpoint kináza 1 je velmi aktuální a intenzivně studovanou komponentou buněčného cyklu. Mnoho úsilí bylo věnováno její funkci v odpovědi buňky na genotoxický stres, kde hraje klíčovou roli v aktivaci kontrolního bodu, neboť se předpokládá, že její inhibicí mohou být nádorové buňky učiněny citlivějšími k terapii využívající DNA-poškozující látky. Absence kontrolního bodu a DNA-opravných mechanismů předurčuje i nádorové buňky k apoptóze nebo senescenci.

Rostoucí počet prací však ukazuje také významnou funkci CHK1 v neovlivněném buněčném cyklu. Tato kináza je nezbytná již pro savčí embryonální vývoj (Liu et al 2000), a tím pádem představuje nenahraditelnou součást mechanismu řídicího buněčnou proliferaci. V somatických buňkách je CHK1 exprimována stabilně v průběhu S a G₂ – fáze (Kaneko et al 1999). Její fosforylace na Ser317 a Ser345 ATM/ATR kinázami byla popsána především v souvislosti s poškozením DNA (Capasso et al 2002, Zhao & Piwnicka-Worms 2001).

Tato práce přináší první doklady o funkci CHK1 v meiotickém zrání u savců. V myších oocytech postupně vzrůstá exprese CHK1 proteinu v průběhu zrání, k masivní fosforylaci však dochází až v MI a MII fázi. Toto chování CHK1 se zásadně liší od situace v mitotických buňkách, kde je její exprese stabilní a k fosforylaci nedochází. Mitotické funkce CHK1 nejsou asociovány s fosforylační aktivací, kinázová aktivita je však nezbytná. Může být zajištěna například lokalizací. V práci Kramera et al (2004b) bylo popsáno, že CHK1 targetovaná na centrosom je aktivní, mimo něj však nikoliv. Samotná vazba CHK1 na centrosom tedy může způsobit změnu konformace nutnou k aktivaci, která je jinak zprostředkována fosforylací.

CHK1 inhibitor SB218078 je na somatických buňkách používán zejména ke studiu G₂/M – kontrolního bodu způsobeného například ionizujícím zářením nebo inhibitory topoizomeráz (Jackson et al 2000). Buňky po ošetření tímto inhibitorem neaktivují G₂/M – kontrolní bod a vstupují do mitózy s poškozenou DNA. Použitím tohoto inhibitoru na oocytech, kde znovuzahájení meiózy představuje obdobu G₂/M – přechodu somatických buněk, by se dalo očekávat například překonání IBMX-bloku a spontánní zahájení zrání. Nicméně CHK1 inhibitor v myších oocytech fungoval právě opačně – jeho účinkem došlo ke zpoždění GVBD. Ukázalo se, že inhibitor působí dočasné snížení CDK1 kinázové

aktivity, čímž vzniklo podezření o jeho možném nespecifickém vlivu na CDK1. Některé práce skutečně indikují, že k interakci mezi CDK1 a CHK1 kinázami může docházet. Lithiem-indukovaná inhibiční fosforylace CDK1 na Tyr15 spolu s aktivací G₂/M – kontrolního bodu byla v populaci nádorových buněk narušena právě inhibitorem SB218078 (Wang et al 2008). V mitotických buňkách je CHK1 dokonce přímo fosforylována CDK1 kinázou na Ser286 a Ser301, význam této interakce však není doposud vysvětlen. Je možné, že CDK1 tímto způsobem ovlivňuje CHK1 kinázovou aktivitu nebo její lokalizaci (Shiromizu et al 2006).

CDK1 aktivita však v oocytech narůstá v průběhu zrání dvakrát, na počátku prvního i druhého meiotického dělení. Výsledky této práce sice ukazují, že CHK1 inhibitor má vliv na CDK1 aktivitu na počátku prvního meiotického dělení, avšak žádné zpoždění nebylo pozorováno při nástupu druhého meiotického dělení. Kdyby inhibitor inhiboval také CDK1, oocyty by byly ovlivněny i v metafázi II.

Vztah mezi CHK1 a CDK1 by ale mohl existovat i prostřednictvím cyklinu B. V CHK1 -/- DT40 buňkách korelovala snížená CDK1 aktivita se snížením hladiny celkového i fosforylovaného cyklinu B (Zachos et al 2007). Nádorové buňky, exprimující vysokou hladinu cyklinu B, jsou senzitivní k inhibici CHK1 indukované inhibitorem, přičemž míra senzitivity koreluje s mírou poklesu cyklinu B (Xiao et al 2008).

Z těchto poznatků vyplývá, že checkpoint kináza 1 se velmi pravděpodobně podílí na znovuzahájení zrání myších oocytů, ačkoliv k úplnému objasnění této její funkce bude zapotřebí ještě dalšího úsilí.

Vlivem inhibice CHK1 byla v průběhu zrání pozorována defektní cytokineze, kdy místo asymetrického vydělení pólového tělíska došlo k symetrickému rozdělení oocyty v důsledku zablokované či zpožděné migraci dělicího vřeténka. Přesně tento jev byl také popsán jako efekt deplece forminu-2 (fmn2), proteinu odpovědného za nukleaci aktinových filament (Dumont et al 2007). Z výsledků této práce vyplynulo, že migrace dělicího vřeténka v myších oocytech je závislá na aktinu, protože u fmn2-/- oocytů vřeteno nemigruje, ale zůstává lokalizováno uprostřed oocyty. Zapojení aktinových filament v migraci dělicího vřeténka může vysvětlovat absenci astrálních mikrotubulů v savčích oocytech, pomocí nichž je v somatických buňkách zajištěna interakce mezi buněčným kortexem a dělicím vřeténkem, která umožňuje migraci vřeténka.

Jestliže je inhibicí CHK1 dosaženo stejného fenotypu jako deplecí forminu-2, je možné spekulovat o možné roli CHK1 v regulaci dynamiky cytoskeletu, především aktinových filament.

Zablokovaná migrace dělicího vřeténka byla pozorována také jako důsledek knock-outu genu *mos* v myších oocytech (Verlhac et al 2000). Vřeténko *mos*^{-/-} oocytů vůbec nemigruje, zůstává lokalizováno v centru oocytu, kde došlo k jeho formaci. K vydělení pólového tělíska však u některých oocytů dojde, a to tak, že jeden pól dělicího vřeténka spolu s jednou sadou chromozomů se enormě prodlouží, až se dostane do blízkosti kortexu, kde je následně indukována kortikální diferenciace. Pólová tělíska jsou však abnormálně velká, protože v důsledku setrvání jednoho pólu vřeténka uprostřed oocytu, dojde k zaškrcení plasmatické membrány a zahájení cytokineze blíže středu oocytu.

Mos-MAPK signální dráha tedy také hraje nezanedbatelnou roli v určení pozice dělicího vřeténka v myších oocytech. Je možné, že CHK1 je v této signalizaci rovněž zapojena, neboť její inhibice vyvolává podobný fenotyp, nicméně přímé doklady o tom prozatím chybí.

Spindle assembly checkpoint monitoruje během prometafáze a metafáze defekty vzniklé nepřipojením mikrotubulů na kinetochory chromozomů. CHK1 je v ptačích DT40 buňkách nezbytná pro funkci SAC (Zachos et al 2007). V přítomnosti taxolu nebyly CHK1-deficientní buňky schopné aktivovat spindle assembly checkpoint. Paradoxně deplece CHK1 v lidských HeLa buňkách vyvolala naopak aktivaci SAC, což by znamenalo, že CHK1 je spíše negativním regulátorem tohoto kontrolního bodu (Tang et al 2006).

Tato práce ukazuje, že CHK1 je v myších oocytech zapojena v aktivaci SAC, protože po inhibici CHK1 dojde v přítomnosti taxolu k narušení SAC u více než 40% oocytů. Některé oocyty po ošetření CHK1 inhibitorem vstupovaly do anafáze, i když chromozomy ještě nebyly seřazeny v metafázní rovině. U myši byl popsán zajímavý jev, kdy oocyty obsahující univalentní chromozomy vůbec neaktivovaly SAC, přestože v mitóze stačí k aktivaci SAC jediný nepřipojený chromozom. Ukázalo se, že univalentní chromozomy jsou schopny vytvořit bipolární spojení s mikrotubuly a "uspokojit" tak nároky SAC kontrolního bodu (Kouznetsova et al 2007).

Otázkou zůstává zda chybné seřazení chromozomů v metafázi I v důsledku inhibice CHK1 vede k překonání SAC podobným způsobem nebo zda je SAC překonán na základě nedostatečné aktivace Aurory-B a MAD a BUB proteinů. V každém případě je účast CHK1 v regulaci SAC kontrolního bodu zcela novým poznatkem, který potvrzuje významnou roli CHK1 v neovlivněném buněčném cyklu.

Pro studium funkce CHK1 v myších oocytech a pro ověření fenotypů pozorovaných po farmakologické inhibici CHK1, byla použita také metoda RNA interference, která je velmi často používanou metodou ke studiu funkce genů.

Deplece CHK1 v somatických DT40 buňkách se projevuje výraznými defekty v segregaci chromozomů (objevují se “zatoulané“ chromozomy) způsobené nepřipojením kinetochor na mikrotubuly (Zachos et al 2007). U těchto buněk navíc po vstupu do mitózy následuje defektní cytokineze. V HeLa buňkách vede deplece CHK1 dokonce k zastavení buněčného cyklu (Tang et al 2006).

Podobně CHK1-depletované myší oocyty mají také problémy s napojením mikrotubulů na kinetochory a při seřazení chromozomů v metafázi rovině. Navíc je zřejmě narušena i struktura dělicího vřeténka, jak je vidět na obrázku 17. Defektní cytokineze byla u těchto oocytů také pozorována, nicméně objevila se také u některých kontrolních, GFP-mikroinjekovaných oocytů, a proto byl tento jev přisuzován spíše dlouhodobému pobytu v IBMX.

Nicméně očekávalo se, že pomocí RNAi bude možné zopakovat fenotypy, které byly pozorovány po inhibici CHK1 inhibitorem SB218078. Tyto předpoklady se však nepotvrdily. Zablokování migrace dělicího vřeténka a diferenciaci kortikální membrány se nepodařilo pomocí RNAi prokázat. K překonání SAC kontrolního bodu indukovaného taxolem po depleci CHK1 rovněž nedošlo. Důvodem rozdílnosti fenotypů pozorovaných po inhibici a depleci CHK1 může být odlišný způsob účinku obou metod. Inhibitor SB218078 brání aktivitě CHK1 kinázy vazbou do ATP-vazebného místa, a tím působí pokles aktivity. Navíc je možné, že inhibitor není stoprocentně specifický pouze pro CHK1 a inhibuje nebo jinak ovlivňuje ještě jiné proteiny, což má ve výsledku větší dopad na průběh zrání oocytu a způsobuje viditelnější defekty. Naproti tomu RNA interference cíleně zasahuje pouze daný protein, v tomto případě CHK1, protože dsRNA působící její degradaci byla navržena přímo podle její sekvence a s vyloučením *off-target* efektů. V důsledku výhradně specifické absence CHK1 pak může být “jemnější“ dopad na zrání oocytu a způsobené defekty.

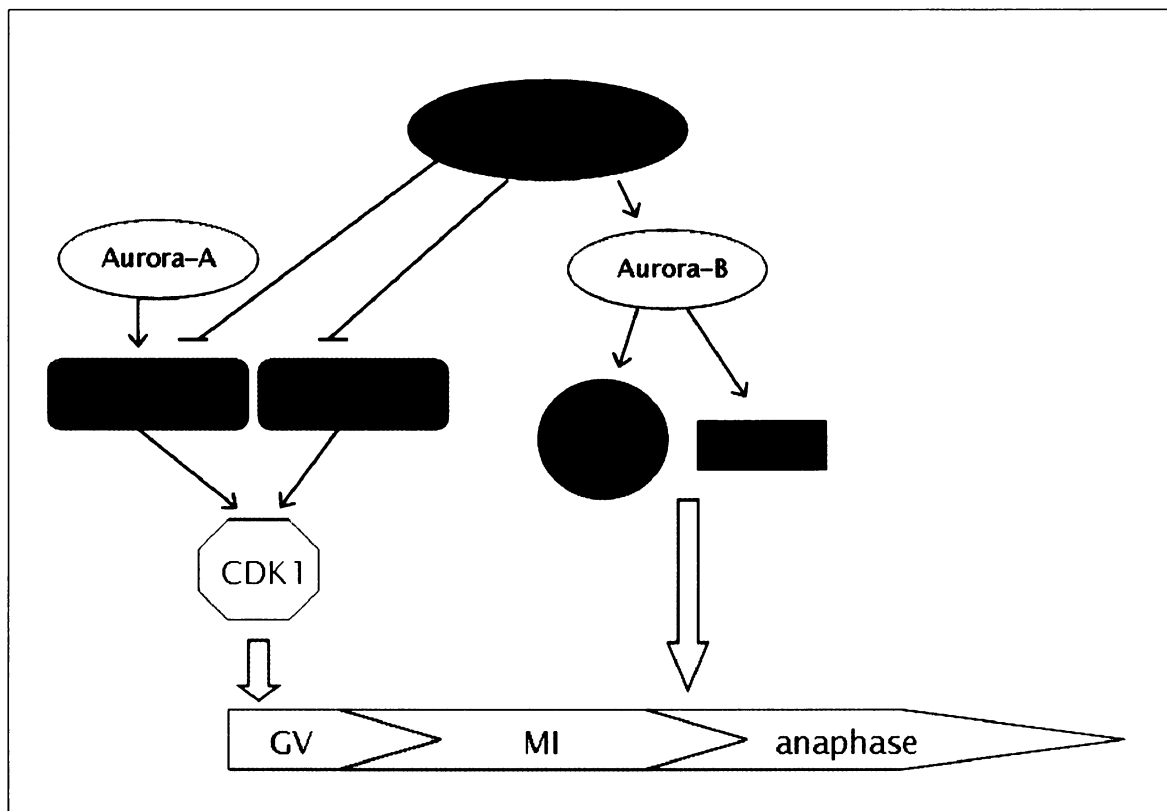
Je také nutno podotknout, že účinkem inhibitoru je snížena aktivita CHK1 kinázy, nicméně protein fyzicky zůstává “na místě činu“, zatímco účinkem RNAi dochází k úplné degradaci proteinu a tím také k eliminaci z místa jeho působení. Tento fakt nemusí být ve skutečnosti významný, ale zatím jej nelze vyloučit.

Jakým způsobem funguje CHK1 na molekulární úrovni může být objasněno ve spojitosti s funkcí CDC25A v myších oocytech, která byla velmi recentně popsána (Solc et al 2008). Tato fosfatáza má významný podíl v regulaci znovuzahájení meiózy a v MI – MII přechodu. CDC25A je exprimována nejvíce v GV-stádiu, v průběhu zrání její exprese, respektive množství detekovaného proteinu, klesá. Toto chování se shoduje s chováním CHK1 kinázy, uvědomíme-li si, že CDC25A patří mezi její hlavní substráty. Nízká hladina CHK1 proteinu v GV-stádiu odpovídá vysoké hladině CDC25A proteinu. Po znovuzahájení meiózy exprese CHK1 stoupá, což koreluje s poklesem CDC25A proteinu, který je nejspíše degradován právě CHK1 kinázou.

O blízkém vztahu těchto dvou molekul svědčí také fenotypy pozorované v důsledku deregulace CDC25A a CHK1. Deplece CHK1 vede k narušení struktury dělicího vřeténka, defektům při seřazení chromozomů v metafázi rovině a problémům při napojení mikrotubulů na kinetochory chromozomů, jak bylo popsáno v této práci. Podobně over-exprese CDC25A vede k defektům při formaci dělicího vřeténka a při seřazení chromozomů, navíc dochází k zastavení zrání v MI fázi. Je tedy zřejmé, že pokud down-regulace CHK1 působí stejný efekt jako up-regulace CDC25A, existuje mezi těmito molekulami pravděpodobně stejný vztah jako v mitotických buňkách, kde CHK1 je negativním regulátorem CDC25A aktivity.

Dalším důkazem o interakci CHK1-CDC25A v myších oocytech je GV-blok způsobený over-expresí CHK1. Jestliže CDC25A má v oocytech stejný aktivační vliv na CDK1 jako v mitóze, její masivní degradace před znovuzahájením meiózy způsobená up-regulací CHK1 je reálným důvodem, proč u oocytů nedojde ani k GVBD. Navíc lokalizace CDC25A i CHK1 v GV-stádiu je výhradně jaderná. CHK1 by se tedy mohla podílet na meiotickém zrání udržováním hladiny CDC25A, která musí být na počátku vysoká a poté poklesnout v průběhu zrání.

Možnou úlohu CHK1 kinázy v meiotickém zrání myších oocytů lze na základě výsledků této práce shrnout v následujícím schématu (Obr.19). V GV-stádiu malé množství přítomné CHK1 kinázy udržuje aktivitu CDC25A fosfatázy, která je nezbytná pro aktivaci CDK1 a znovuzahájení meiózy. Pravděpodobně CHK1 také reguluje CDC25B fosfatázu, která je nejspíše odpovědná za iniciační aktivaci CDK1 a je aktivována Aurorou-A, také přítomnou v GV-stádiu myších oocytů. V MI fázi CHK1 zajišťuje správné načasování vstupu do anafáze fosforylací Aurory-B až ve chvíli, kdy jsou všechny chromozomy připojeny na kinetochory dělicího vřeténka. Aktivní Aurora-B poté fosforyluje Mad2 a BubR1 proteiny, čímž je umožněn vstup do anafáze.



Obrázek 19: Schéma možné signalizace CHK1 v průběhu meiotického zrání myších oocytů.

Interakce uvedené v tomto modelu však z velké části nebyly dosud experimentálně prokázány, nicméně jsou založeny na předběžných výsledcích, které tomuto stavu napovídají. Přesnější pohled na funkci CHK1 zajisté přinese nezbytný knock-out tohoto genu v myších oocytech, který definitivně potvrdí nebo vyvrátí výsledky prezentované v této diplomové práci.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce přináší první poznatky o funkci checkpoint kinázy 1 (CHK1) v meiotickém zrání myších oocytů. Dosažené výsledky mohou být shrnuty v těchto následujících bodech:

- exprese CHK1 na úrovni proteinu v průběhu zrání narůstá, k jeho fosforylaci dochází především v MI a MII fázi
- chemická inhibice CHK1 pomocí inhibitoru SB218078 způsobuje zpoždění GVBD a dočasně snižuje aktivitu CDK1 kinázy
- migrace dělicího vřeténka a diferenciaci kortikální membrány je inhibicí CHK1 narušena, v důsledku toho dochází k defektní cytokinezi
- spindle assembly checkpoint indukovaný taxolem je po inhibici CHK1 překonán
- deplece CHK1 pomocí RNA interference nepůsobí stejně jako chemická inhibice, ale vede k chybám v seřazení chromozomů a jejich segregaci
- over-exprese CHK1 způsobuje zablokování zrání v GV-stádiu, CHK1 se lokalizuje především v jádře

Úloha CHK1 během zrání myších oocytů je tedy poměrně komplexní. Vytčený cíl práce charakterizovat funkci CHK1 v meiotickém zrání byl úspěšně splněn. Data získaná v této pilotní studii budou použita pro publikaci v *Developmental biology*.

SEZNAM ZKRATEK

14-3-3	protein, vázající se na konsensus sekvenci RSXSXP, kde S značí fosforylovaný serin a X libovolnou aminokyselinu
9-1-1	heterotrimerický komplex sestávající z proteinů RAD1, RAD9, HUS1; váže se na DNA v místě poškození
3'-UTR	3' <i>untranslated region</i> , nepřekládaný konec mRNA
5'-UTR	5' <i>untranslated region</i> , nepřekládaný konec mRNA
AKAP450	<i>A-kinase anchore protein 450</i>
APC/C	<i>anaphase-promoting complex/cyclosome</i> , E3-ubiquitinligáza katalyzující polyubiquitinaci proteinů určených k degradaci
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i> , proximální kináza aktivovaná poškozením DNA (vznikem DNA dvojřetězcových zlomů (DSB))
ATR	<i>ataxia-telangiectasia and RAD3 related</i> , proximální kináza aktivovaná poškozením DNA za přispění ATM
ATRIP	<i>ATR-interacting protein</i> , protein, který se podílí na aktivaci ATR
BRCA1	<i>breast cancer susceptibility gene</i> , mediátor signálu při aktivaci kontrolního bodu po poškození DNA
BUB	<i>budding uninhibited by benzimidazoles</i> , kináza účastnící se SAC
BUBR1	protein účastnící se SAC
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
β-TrcP	F-box protein, nutný k degradaci CDC25A, součást SCF-ubiquitin ligázy
c-AMP	cyklický adenosin monofosfát tvořený adenylát cyklázou
c-MYC	transkripční faktor exprimovaný na konci G ₁ – fáze
c-NAP1	<i>nucleosome assembly protein</i>
CDC6	<i>cell division cycle 6</i> , protein nezbytný pro vytvoření replikačních počátků
CDC25	<i>cell division cycle 25</i> , rodina duálně specifických fosfatáz schopných defosforylovat T14 a Y15 na CDK1/2
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i> , cyklin dependentní kináza
CDR1	kvasinková kináza inaktivující WEE1
CDR2	kvasinková kináza inaktivující WEE1
CEP3891	farmakologický inhibitor CHK1
CHK1	<i>checkpoint kinase 1</i> , efektorová kináza ATM/ATR signální dráhy, kromě funkce v odpovědi buňky na poškození DNA hraje roli také v neovlivněném buněčném cyklu
CHK2	<i>checkpoint kinase 2</i> , efektorová kináza ATM/ATR signální dráhy, podílí se na zastavení buněčného cyklu a apoptózy

CLS	cytoplasmic <i>localisation signal</i> , sekvence v proteinu odpovědná za export proteinu z jádra
CRB2	protein s podobnou funkcí jako 14-3-3 protein
CSF	<i>cytostatic factor</i> , cytostatický faktor udržující oocyty v metafázi II do oplození, udržuje vysokou aktivitu CDK1
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DIS2	kvasinková protein fosfatáza typu 1 defosforylující CHK1
dsRNA	<i>double stranded RNA</i>
E2F	transkripční faktor exprimovaný na konci G ₁ – fáze, aktivuje geny pro S-fázi
F-box	F-box proteiny určují substrátovou specifitu SCF1 komplexu
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GSK-3	<i>glycogen synthase kinase 3</i> , kináza glykogen syntázy, která kromě metabolické funkce plní také důležitou roli v regulaci cyklinu D a Aurory-A
GVBD	<i>germinal vesical breakdown</i> , rozpad zárodečného váčku (jaderné membrány) indikující znovuzahájení meiózy
H2AX	varianta histonu H2A fosforylovaná při poškození DNA
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , enzym používaný při detekci proteinů
HUS1	homolog kvasinkového Hus1 genu, součást 9-1-1 komplexu
IBMX	<i>3-isobutyl-1-methyl-xanthine</i> , inhibitor PDE-3A
INCENP	<i>inner centromere protein</i> , protein stimulující aktivitu Aurory-B
LH	luteinizační hormon, iniciuje znovuzahájení meiózy a expanzi kumulu
MAD	<i>mitotic arrest deficient</i> , kinetochorový protein
MAD2	<i>mitotic arrest deficient 2</i> , kinetochorový protein aktivovaný Aurorou-B
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> , mitogeny aktivovaná protein kináza
MAPs	<i>microtubule associated proteins</i> , proteiny interagující s mikrotubuly
MDC1	<i>mediator of DNA damage checkpoint 1</i> , protein účastnící se šíření signálu po poškození DNA
MOS	kináza aktivující MAP-signální dráhu v oocytech
MPF	<i>M-phase promoting factor</i> , historické označení pro CDK1/cyklinB komplex
MRE11	<i>meiotic-recombination protein-11</i> , součást MRN nukleázového komplexu
MRN	komplex proteinů MRE11, RAD50, NBS1 rozpoznávající poškození DNA
MTOC	<i>microtubule organizing centre</i> , organizační centrum mikrotubulů
MYT1	kináza, která inhibičně fosforyluje CDK1 na Thr14 a Tyr15
NBS1	<i>Nijmegen-breakage-syndrome-1</i> , součást MRN nukleázového komplexu
NGS	<i>normal goat serum</i>

NLS	<i>nuclear localisation signal</i> , sekvence v proteinu odpovědná za import proteinu do jádra
p21	přirozený inhibitor CDK
p53	přirozený inhibitor CDK
PACT	<i>pericentrin - AKAP 450 centrosomal targeting</i> , doména AKAP450 proteinu pericentriolární matrix
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>phosphate buffer solution</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i> , protein účastnící se replikace DNA
PDE-3A	fosfodiesteráza, štěpící cAMP na AMP, specifická pro oocyty, nezbytná pro znovuzahájení meiózy u myši
PI3K	<i>phosphatidylinositide-3-kinase</i> , kináza nutná pro aktivaci PKB
PKA	protein kináza A, kináza aktivovaná vysokou hladinou cAMP
PKB	protein kináza B, aktivovaná PI3K kinázou a dalšími molekulami
PLK1	<i>polo-like kinase 1</i> , mitotická kináza
PMSG	<i>pregnant mare serum gonadotropin</i> , sérový gonadotropin z březích klisen používaný pro stimulaci růstu folikulů
PVA	<i>polyvinylalcohol</i>
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i> , membrána optimalizovaná pro western blotting
qPCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RAD50	homolog kvasinkového Rad50 genu, součást MRN nukleázového komplexu
RAD1	homolog kvasinkového Rad1 genu, součást 9-1-1 komplexu
RAD9	homolog kvasinkového Rad9 genu, součást 9-1-1 komplexu
RPA	<i>replication protein A</i> , protein vážící se na ssDNA
SAC	<i>spindle assembly checkpoint</i> , kontrolní bod na pomezí metafáze a anafáze
SB218078	farmakologický inhibitor CHK1
SCF	E3-ubiquitin ligáza aktivní v G1 – fázi
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMC1	<i>structural maintenance of chromosome</i> , kohezinový protein, jehož fosforylace zastavuje replikační vidlici
TLK	<i>tousled-like kinase</i> , kináza zapojená v remodelaci chromatinu
T-TBS	<i>tween/ tris-buffered salt solution</i>
TOPBP1	<i>DNA topoisomerase II-beta binding protein 1</i> , adaptorový protein účastnící se aktivace CHK1
UCN-1	farmakologický inhibitor CHK1
WEE1	kináza, která inhibičně fosforyluje CDK1 na Thr14 a Tyr15

SEZNAM LITERATURY

- Andersen CB, Sakaue H, Nedachi T, Kovacina KS, Clayberger C, et al. 2003. Protein kinase B/Akt is essential for the insulin- but not progesterone-stimulated resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Biochem J* 369: 227-38
- Anger M, Stein P, Schultz RM. 2005. CDC6 requirement for spindle formation during maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod* 72: 188-94
- Antoni L, Sodha N, Collins I, Garrett MD. 2007. CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? *Nat Rev Cancer* 7: 925-36
- Baldin V, Theis-Febvre N, Benne C, Froment C, Cazales M, et al. 2003. PKB/Akt phosphorylates the CDC25B phosphatase and regulates its intracellular localisation. *Biol Cell* 95: 547-54
- Bansal P, Lazo JS. 2007. Induction of Cdc25B regulates cell cycle resumption after genotoxic stress. *Cancer Res* 67: 3356-63
- Bartek J, Lukas C, Lukas J. 2004. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 792-804
- Bartek J, Lukas J. 2001. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 13: 738-47
- Bartek J, Lukas J. 2003. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3: 421-9
- Bartek J, Lukas J. 2007. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* 19: 238-45
- Bonnet J, Coopman P, Morris MC. 2008. Characterization of centrosomal localization and dynamics of Cdc25C phosphatase in mitosis. *Cell Cycle* 7: 1991-8
- Bourke E, Dodson H, Merdes A, Cuffe L, Zachos G, et al. 2007. DNA damage induces Chk1-dependent centrosome amplification. *EMBO Rep* 8: 603-9
- Boutros R, Ducommun B. 2008. Asymmetric localization of the CDC25B phosphatase to the mother centrosome during interphase. *Cell Cycle* 7: 401-6
- Brondello JM, Ducommun B, Fernandez A, Lamb NJ. 2007. Linking PCNA-dependent replication and ATR by human Claspin. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 1028-33
- Calonge TM, O'Connell MJ. 2008. Turning off the G2 DNA damage checkpoint. *DNA Repair (Amst)* 7: 136-40
- Capasso H, Palermo C, Wan S, Rao H, John UP, et al. 2002. Phosphorylation activates Chk1 and is required for checkpoint-mediated cell cycle arrest. *J Cell Sci* 115: 4555-64
- Carrassa L, Sanchez Y, Erba E, Damia G. 2008. U2os Cells Lacking Chk1 Undergo Aberrant Mitosis and Fail to Activate the Spindle Checkpoint. *J Cell Mol Med*
- Cazales M, Schmitt E, Montembault E, Dozier C, Prigent C, Ducommun B. 2005. CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle* 4: 1233-8

- Deckbar D, Birraux J, Krempler A, Tchouandong L, Beucher A, et al. 2007. Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *J Cell Biol* 176: 749-55
- den Elzen N, Kosoy A, Christopoulos H, O'Connell MJ. 2004. Resisting arrest: recovery from checkpoint arrest through dephosphorylation of Chk1 by PP1. *Cell Cycle* 3: 529-33
- den Elzen NR, O'Connell MJ. 2004. Recovery from DNA damage checkpoint arrest by PP1-mediated inhibition of Chk1. *EMBO J* 23: 908-18
- Donzelli M, Draetta GF. 2003. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* 4: 671-7
- Doxsey S, McCollum D, Theurkauf W. 2005a. Centrosomes in cellular regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 411-34
- Doxsey S, Zimmerman W, Mikule K. 2005b. Centrosome control of the cell cycle. *Trends Cell Biol* 15: 303-11
- Dumont J, Million K, Sunderland K, Rassinier P, Lim H, et al. 2007. Formin-2 is required for spindle migration and for the late steps of cytokinesis in mouse oocytes. *Dev Biol* 301: 254-65
- Dutertre S, Cazales M, Quaranta M, Froment C, Trabut V, et al. 2004. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci* 117: 2523-31
- Enders GH. 2008. Expanded roles for chk1 in genome maintenance. *J Biol Chem* 283: 17749-52
- Chen MS, Hurov J, White LS, Woodford-Thomas T, Piwnica-Worms H. 2001. Absence of apparent phenotype in mice lacking Cdc25C protein phosphatase. *Mol Cell Biol* 21: 3853-61
- Chen MS, Ryan CE, Piwnica-Worms H. 2003. Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol* 23: 7488-97
- Chen P, Luo C, Deng Y, Ryan K, Register J, et al. 2000. The 1.7 Å crystal structure of human cell cycle checkpoint kinase Chk1: implications for Chk1 regulation. *Cell* 100: 681-92
- Chen Y, Poon RY. 2008. The multiple checkpoint functions of CHK1 and CHK2 in maintenance of genome stability. *Front Biosci* 13: 5016-29
- Chen Y, Sanchez Y. 2004. Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. *DNA Repair (Amst)* 3: 1025-32
- Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J. 2003. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* 5: 143-8
- Jackson JR, Gilmartin A, Imburgia C, Winkler JD, Marshall LA, Roshak A. 2000. An indolocarbazole inhibitor of human checkpoint kinase (Chk1) abrogates cell cycle arrest caused by DNA damage. *Cancer Res* 60: 566-72
- Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GC, et al. 2006. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 8: 37-45
- Kalous J, Solc P, Baran V, Kubelka M, Schultz RM, Motlik J. 2006. PKB/AKT is involved in resumption of meiosis in mouse oocytes. *Biol Cell* 98: 111-23

- Kaneko YS, Watanabe N, Morisaki H, Akita H, Fujimoto A, et al. 1999. Cell-cycle-dependent and ATM-independent expression of human Chk1 kinase. *Oncogene* 18: 3673-81
- Kim EM, Burke DJ. 2008. DNA damage activates the SAC in an ATM/ATR-dependent manner, independently of the kinetochore. *PLoS Genet* 4: e1000015
- King FW, Skeen J, Hay N, Shtivelman E. 2004. Inhibition of Chk1 by activated PKB/Akt. *Cell Cycle* 3: 634-7
- Kishimoto T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Curr Opin Cell Biol* 15: 654-63
- Kouznetsova A, Lister L, Nordenskjold M, Herbert M, Hoog C. 2007. Bi-orientation of achiasmatic chromosomes in meiosis I oocytes contributes to aneuploidy in mice. *Nat Genet* 39: 966-8
- Kramer A, Lukas J, Bartek J. 2004a. Checking out the centrosome. *Cell Cycle* 3: 1390-3
- Kramer A, Mailand N, Lukas C, Syljuasen RG, Wilkinson CJ, et al. 2004b. Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat Cell Biol* 6: 884-91
- Lam MH, Liu Q, Elledge SJ, Rosen JM. 2004. Chk1 is haploinsufficient for multiple functions critical to tumor suppression. *Cancer Cell* 6: 45-59
- Lau E, Zhu C, Abraham RT, Jiang W. 2006. The functional role of Cdc6 in S-G2/M in mammalian cells. *EMBO Rep* 7: 425-30
- Lee J, Kumagai A, Dunphy WG. 2003. Claspin, a Chk1-regulatory protein, monitors DNA replication on chromatin independently of RPA, ATR, and Rad17. *Mol Cell* 11: 329-40
- Lincoln AJ, Wickramasinghe D, Stein P, Schultz RM, Palko ME, et al. 2002. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat Genet* 30: 446-9
- Lindqvist A, Kallstrom H, Lundgren A, Barsoum E, Rosenthal CK. 2005. Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. *J Cell Biol* 171: 35-45
- Lindqvist A, van Zon W, Karlsson Rosenthal C, Wolthuis RM. 2007. Cyclin B1-Cdk1 activation continues after centrosome separation to control mitotic progression. *PLoS Biol* 5: e123
- Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, et al. 2000. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14: 1448-59
- Liu S, Bekker-Jensen S, Mailand N, Lukas C, Bartek J, Lukas J. 2006. Claspin operates downstream of TopBP1 to direct ATR signaling towards Chk1 activation. *Mol Cell Biol* 26: 6056-64
- Loffler H, Bochtler T, Fritz B, Tews B, Ho AD, et al. 2007. DNA damage-induced accumulation of centrosomal Chk1 contributes to its checkpoint function. *Cell Cycle* 6: 2541-8
- Loffler H, Lukas J, Bartek J, Kramer A. 2006a. Structure meets function--centrosomes, genome maintenance and the DNA damage response. *Exp Cell Res* 312: 2633-40
- Loffler H, Rebacz B, Ho AD, Lukas J, Bartek J, Kramer A. 2006b. Chk1-dependent regulation of Cdc25B functions to coordinate mitotic events. *Cell Cycle* 5: 2543-7

- Lukas C, Falck J, Bartkova J, Bartek J, Lukas J. 2003. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol* 5: 255-60
- Lukas C, Melander F, Stucki M, Falck J, Bekker-Jensen S, et al. 2004a. Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J* 23: 2674-83
- Lukas J, Lukas C, Bartek J. 2004b. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* 3: 997-1007
- Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuasen RG, Welcker M, et al. 2000. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* 288: 1425-9
- Mailand N, Podtelejnikov AV, Groth A, Mann M, Bartek J, Lukas J. 2002. Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J* 21: 5911-20
- Nakajo N, Oe T, Uto K, Sagata N. 1999. Involvement of Chk1 kinase in prophase I arrest of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* 207: 432-44
- Niault T, Hached K, Sotillo R, Sorger PK, Maro B, et al. 2007. Changing Mad2 levels affects chromosome segregation and spindle assembly checkpoint control in female mouse meiosis I. *PLoS ONE* 2: e1165
- Niida H, Katsuno Y, Banerjee B, Hande MP, Nakanishi M. 2007. Specific role of Chk1 phosphorylations in cell survival and checkpoint activation. *Mol Cell Biol* 27: 2572-81
- Niida H, Nakanishi M. 2006. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* 21: 3-9
- Oe T, Nakajo N, Katsuragi Y, Okazaki K, Sagata N. 2001. Cytoplasmic occurrence of the Chk1/Cdc25 pathway and regulation of Chk1 in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* 229: 250-61
- Okita N, Kudo Y, Tanuma S. 2007. Checkpoint kinase 1 is cleaved in a caspase-dependent pathway during genotoxic stress-induced apoptosis. *Biol Pharm Bull* 30: 359-62
- Palermo C, Hope JC, Freyer GA, Rao H, Walworth NC. 2008. Importance of a C-terminal conserved region of Chk1 for checkpoint function. *PLoS ONE* 3: e1427
- Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnicka-Worms H. 1997. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 277: 1501-5
- Peters JM. 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 644-56
- Ray D, Terao Y, Fuhrken PG, Ma ZQ, DeMayo FJ, et al. 2007a. Deregulated CDC25A expression promotes mammary tumorigenesis with genomic instability. *Cancer Res* 67: 984-91
- Ray D, Terao Y, Nimbalkar D, Hirai H, Osmundson EC, et al. 2007b. Hemizygous disruption of Cdc25A inhibits cellular transformation and mammary tumorigenesis in mice. *Cancer Res* 67: 6605-11
- Reis A, Chang HY, Levasseur M, Jones KT. 2006. APC^{cdh1} activity in mouse oocytes prevents entry into the first meiotic division. *Nat Cell Biol* 8: 539-40

- Reis A, Madgwick S, Chang HY, Nabti I, Levasseur M, Jones KT. 2007. Prometaphase APC^{cdh1} activity prevents non-disjunction in mammalian oocytes. *Nat Cell Biol* 9: 1192-8
- Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, et al. 1997. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* 277: 1497-501
- Saskova A, Solc P, Baran V, Kubelka M, Schultz RM, Motlik J. 2008. Aurora kinase A controls meiosis I progression in mouse oocytes. *Cell Cycle* 7
- Scorah J, Dong MQ, Yates JR, 3rd, Scott M, Gillespie D, McGowan CH. 2008. A Conserved Proliferating Cell Nuclear Antigen-interacting Protein Sequence in Chk1 Is Required for Checkpoint Function. *J Biol Chem* 283: 17250-9
- Shimada M, Nakanishi M. 2008. Checkpoints meet the transcription at a novel histone milestone (H3-T11). *Cell Cycle* 7: 1555-9
- Shiromizu T, Goto H, Tomono Y, Bartek J, Totsukawa G, et al. 2006. Regulation of mitotic function of Chk1 through phosphorylation at novel sites by cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1). *Genes Cells* 11: 477-85
- Schmitt E, Boutros R, Froment C, Monsarrat B, Ducommun B, Dozier C. 2006. CHK1 phosphorylates CDC25B during the cell cycle in the absence of DNA damage. *J Cell Sci* 119: 4269-75
- Solc P, Saskova A, Baran V, Kubelka M, Schultz RM, Motlik J. 2008. CDC25A phosphatase controls meiosis I progression in mouse oocytes. *Dev Biol* 317: 260-9
- Sorensen CS, Syljuasen RG, Falck J, Schroeder T, Ronnstrand L, et al. 2003. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 3: 247-58
- Syljuasen RG, Sorensen CS, Hansen LT, Fugger K, Lundin C, et al. 2005. Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol* 25: 3553-62
- Takai H, Naka K, Okada Y, Watanabe M, Harada N, et al. 2002. Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *EMBO J* 21: 5195-205
- Takai H, Tominaga K, Motoyama N, Minamishima YA, Nagahama H, et al. 2000. Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev* 14: 1439-47
- Tang J, Erikson RL, Liu X. 2006. Checkpoint kinase 1 (Chk1) is required for mitotic progression through negative regulation of polo-like kinase 1 (Plk1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11964-9
- Verlhac MH, Lefebvre C, Guillaud P, Rassinier P, Maro B. 2000. Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Curr Biol* 10: 1303-6
- Vitale I, Galluzzi L, Vivet S, Nanty L, Dessen P, et al. 2007. Inhibition of Chk1 kills tetraploid tumor cells through a p53-dependent pathway. *PLoS ONE* 2: e1337
- Wakefield JG, Stephens DJ, Tavaré JM. 2003. A role for glycogen synthase kinase-3 in mitotic spindle dynamics and chromosome alignment. *J Cell Sci* 116: 637-46

- Walworth N, Davey S, Beach D. 1993. Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature* 363: 368-71
- Walworth NC, Bernards R. 1996. rad-dependent response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science* 271: 353-6
- Wang XM, Li J, Feng XC, Wang Q, Guan DY, Shen ZH. 2008. Involvement of the role of Chk1 in lithium-induced G2/M phase cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biochem* 104: 1181-91
- Wassmann K, Niaux T, Maro B. 2003. Metaphase I arrest upon activation of the Mad2-dependent spindle checkpoint in mouse oocytes. *Curr Biol* 13: 1596-608
- Xiao Z, Xue J, Gu WZ, Bui M, Li G, et al. 2008. Cyclin B1 is an efficacy-predicting biomarker for Chk1 inhibitors. *Biomarkers*: 1-18
- Yang XH, Shiotani B, Classon M, Zou L. 2008. Chk1 and Claspin potentiate PCNA ubiquitination. *Genes Dev* 22: 1147-52
- Yao LJ, Zhong ZS, Zhang LS, Chen DY, Schatten H, Sun QY. 2004. Aurora-A is a critical regulator of microtubule assembly and nuclear activity in mouse oocytes, fertilized eggs, and early embryos. *Biol Reprod* 70: 1392-9
- Yu H. 2007. Chk1: a double agent in cell cycle checkpoints. *Dev Cell* 12: 167-8
- Zachos G, Black EJ, Walker M, Scott MT, Vagnarelli P, et al. 2007. Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev Cell* 12: 247-60
- Zachos G, Gillespie DA. 2007. Exercising restraints: role of Chk1 in regulating the onset and progression of unperturbed mitosis in vertebrate cells. *Cell Cycle* 6: 810-3
- Zachos G, Rainey M, Gillespie DA. 2003a. Lethal errors in checkpoint control--life without Chk1. *Cell Cycle* 2: 14-6
- Zachos G, Rainey MD, Gillespie DA. 2003b. Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects. *EMBO J* 22: 713-23
- Zhang S, Hemmerich P, Grosse F. 2007. Centrosomal localization of DNA damage checkpoint proteins. *J Cell Biochem* 101: 451-65
- Zhao B, Bower MJ, McDevitt PJ, Zhao H, Davis ST, et al. 2002. Structural basis for Chk1 inhibition by UCN-01. *J Biol Chem* 277: 46609-15
- Zhao H, Piwnicka-Worms H. 2001. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Biol Cell* 21: 4129-39
- Zhou BB, Bartek J. 2004. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer* 4: 216-25
- Zhou BB, Elledge SJ. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408: 433-9

Elektronické zdroje:

- [1] CELL BIOLOGY (Chapter 11: Cell proliferation and its regulation) [cit. 2008-07-03]
WWW: [http://219.221.200.61/ywwy/zbsw\(E\)/edetail11.htm](http://219.221.200.61/ywwy/zbsw(E)/edetail11.htm)