

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Speciální chemicko–biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Lenka Stolařová

**Význam Chk2 kinázy ve vnitrobuněčné signalizaci a důsledky jejích poruch
v onkogenezi**

**Intracellular signalling of Chk2 kinase and impact of its defects
in oncogenesis**

Bakalářská práce

Školitel: Doc. MUDr. Zdeněk Kleibl, PhD.

Praha, 2013

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2013

Lenka Stolařová

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Doc. MUDr. Zdeňku Kleiblovi, PhD. za věnovaný čas, trpělivost a odborné konzultace. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Petře Kleiblové, PhD za cenné rady a připomínky.

Abstrakt

Kináza Chk2 (checkpoint kinase 2), ovlivňující kontrolní body buněčného cyklu, je kódována genem *CHEK2*. Patří mezi serin/threoninové kinázy a její dominantní aktivitou je regulace a intracelulární distribuce signálu v odpovědi na přítomnost poškození genomové DNA. Aktivátorem Chk2 je kináza ATM fosforylující Thr68 v oblasti FHA domény Chk2. Vyvolaná sterická změna indukuje homodimerizaci Chk2 a aktivační fosforylaci v oblasti kinázové domény. Následně disociující katalyticky aktivní protomery Chk2 a fosforylují intracelulární proteiny (p53, E2F-1, BRCA1, Cdc25A a C, BRCA2 a PLK3), čímž se Chk2 podílí na zástavě buněčného cyklu, regulaci reparace DNA a apoptózy. Vrozené mutace v genu *CHEK2* byly nalezeny v souvislosti se zvýšeným výskytem řady nádorových onemocnění, včetně karcinomu prsu a kolorekta a ztráta funkce Chk2 se tak podílí na procesu nádorové transformace.

Klíčová slova:

CHEK2, Chk2, reparace DNA, buněčný cyklus, apoptóza, ATM, p53, Cdc25A, Cdc25C, BRCA2, PLK3, nádorová predispozice, karcinom prsu

Abstract

Chk2 (checkpoint kinase 2), a regulatory protein of the cell cycle checkpoints, is coded by *CHEK2* gene. Chk2 belongs to serine/threonine kinase family and its dominant activity is in regulation and signal distribution of intracellular response to DNA damage. The upstream regulator of Chk2 protein is the ATM kinase that activates Chk2 by its phosphorylation on Thr68 localized in FHA domain. This in turn leads to the conformation change inducing homodimerization of Chk2 protomers and their activating phosphorylation within their kinase domains. Upon phosphorylation, catalytically active Chk2 protomers dissociate and phosphorylate various intracellular proteins (incl. p53, E2F-1, BRCA1, Cdc25A a C, BRCA2 a PLK3). By regulation of these proteins, Chk2 contributes to the cell cycle arrest, regulation of DNA repair and apoptosis. Germline mutations in *CHEK2* gene were identified with the increased frequency in many human cancers, including breast and colorectal cancer. Hence, the failure of Chk2 intracellular activity contributes to the process of malignant transformation.

Key words:

CHEK2, Chk2, DNA repair, cell cycle, apoptosis, ATM, p53, Cdc25A, Cdc25C, BRCA2, PLK3, cancer predisposition, breast cancer

Obsah

Seznam zkratek	2
1 Úvod.....	3
2 Struktura genu <i>CHEK2</i> a jeho proteinového produktu	5
2.1 Identifikace checkpoint kinázy 2	5
2.2 Lidský gen <i>CHEK2</i>	5
2.3 Struktura <i>CHK2</i> proteinu.....	6
3 Regulace kinázové aktivity proteinu Chk2	8
3.1 Aktivace Chk2	8
3.2 Inaktivace Chk2	11
4 Substráty kinázové aktivity Chk2 a jejich význam v intracelulární signalizaci.....	12
4.1 Transkripční faktor p53	13
4.2 Transkripční faktor E2F-1	14
4.3 Tumor supresorový protein BRCA1.....	15
4.4 Fosfatázy Cdc25A, Cdc25C	16
4.5 BRCA2	18
4.6 PLK3.....	19
5 Význam vrozených alterací <i>CHEK2</i> v patogenezi lidských nádorových onemocnění	20
6 Závěr.....	23
7 Seznam použité literatury	24

Seznam zkratek

Zkratka	-	Plný název
53BP1	-	p53-binding protein 1
ADP/ATP	-	Adenosine diphosphate/adenosine triphosphate
ATM	-	Ataxia-telangiectasia mutated
ATR	-	Ataxia-telangiectasia and Rad53-related
BARD1	-	BRCA1-associated RING domain 1
Bax	-	Bcl2-associated X protein
BRCA1/2	-	Breast cancer susceptibility protein type 1/2
BRCT	-	BRCA1 C-terminal domain
Cdc25A/C	-	Cell division cycle 25A/C
Cdk1/2	-	Cyclin-dependent kinase 1/2
CDKN1A	-	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
DBD	-	DNA-binding domain
DDSB	-	DNA double-strand breaks
dNTP	-	Deoxyribonucleotide triphosphate
E2F-1	-	E2F transcription factor 1
FHA	-	Forkhead-associated domain
HR	-	Homologous recombination
CHEK1/2	-	Cell cycle checkpoint kinase gen 1/2
Chk1/2	-	Cell cycle checkpoint kinase protein 1/2
KD	-	Kinase domain
KPNA- α 2/ β 1	-	Karyopherin- α 2/ β 1
Mdm2	-	Mouse double minute 2
MPF	-	Mitosis-promoting factor
mRNA	-	messenger RNA (ribonucleic acid)
NHEJ	-	Non-homologous end joining
p53	-	Tumor protein 53
OMIM	-	Online Mendelian Inheritance in Man
PIKK	-	Phosphatidylinositol-3-kinase-related kinase
PLK1/3	-	Polo-like kinase1/3
PP2C	-	Protein phosphatase 2C
Ptc2/3	-	Papillary toroid carcinoma 2/3
PUMA	-	p53-upregulated modulator of apoptosis
SCD	-	SQ/TQ cluster domain
TAD	-	Transcription activation domain
TP53	-	Transformation-related protein 53
Waf1	-	Wild-type p53-activated fragment 1
Wip1	-	Wild-type p53-induced phosphatase 1
WT	-	Wild-type

1 Úvod

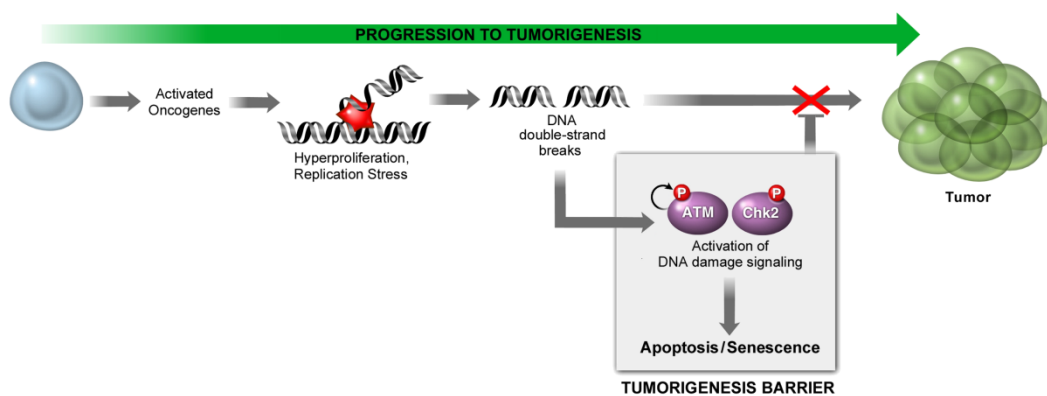
Tkáňová homeostáza je základním předpokladem fyziologické funkce tkání mnohobuněčného organismu. Lze si ji ve zjednodušující podobě představit jako dynamický rovnovážný stav mezi vznikem buněk, zajišťovaným buněčným dělením v průběhu buněčného cyklu, a zánikem nevyhovujících buněk cestou apoptózy. Oba klíčové děje, buněčný cyklus a apoptóza, jsou aktivní, geneticky kódované procesy, které jsou do značné míry reprezentovány fylogeneticky konzervativními strategiemi. Jejich přesné řízení vyžaduje zachování integrity genomu, a tím stability genetické informace, v podobě DNA předávané při buněčném dělení dceřiným buňkám. Kontrola poškození struktury DNA, neustále indukované různými endogenními i exogenními vlivy, a následná oprava DNA proto reprezentuje důležitou součást života buněk. Jejich aktuální stav je při průchodu buněčným cyklem ověřován v kontrolních bodech (tzv. checkpoints). Tyto body sestávají ze signálních kaskád, které umožňují vyhodnocení a integraci informací o aktuálních intracelulárních podmínkách, a v závislosti na případném konkrétním poškození DNA dále spouští cílenou odpověď buňky. Buňka může v případě poruch struktury DNA buněčný cyklus pozastavit a zajistit expresi genů kódujících proteiny účastníci se opravných procesů poruch genomové DNA. Pokud je poškození DNA neopravitelné a buňka v průběhu aktivace buněčného cyklu již překonala hlavní restriktivní bod v G₀ fázi, dochází k iniciaci apoptózy. Z těchto důvodů je pravděpodobné, že řízení buněčného cyklu, reparace DNA a apoptózy musí mít překrývající se řízení na úrovni kontrolních bodů buněčného cyklu.

Při poruše procesů opravy DNA, které mohou být způsobeny řadou genetických i epigenetických mechanismů, nejsou vzniklé chyby reparovány korektním způsobem. Hromadící se genetické změny mohou ve svém konečném důsledku vést k přeměně buňky na nádorovou. Odpověď na poškození genomové DNA spolu s procesy zajišťujícími reparaci poškozené DNA tak pravděpodobně reprezentují důležitou protinádorovou bariéru (Bartkova *et al.* 2005).

Poruchy struktury genomové DNA zasahují všechny strukturní etáže. Z hlediska kancerogeneze vysoce závažné poškození představují zlomy obou vláken dvoušroubovice DNA (DNA double-stranded breaks; DDSBs). Může k nim docházet v průběhu přirozených procesů v buňce, jako jsou například rekombinace DNA při meióze, přeskupování V(D)J segmentů v genech pro imunoglobuliny nebo poruchy replikace DNA při zhroucení replikační vidlice. Mezi významné vnější vlivy způsobující zlomy obou vláken, se řadí ionizační záření, které je způsobuje jak přímo, tak nepřímo produkcí reaktivních kyslíkových radikálů.

Důsledkem dvouřetězcových zlomů mohou být různé genetické alterace jako jsou delece, translokace nebo ztráta chromozomů, ale také buněčná smrt. Schopnost opravy dvouřetězcových zlomů je v eukaryotní buňce zajištěna mechanismy nehomologního spojování konců (non-homologous end joining; NHEJ) a homologní rekombinací (HR). Výsledný opravný mechanismus se může lišit v závislosti na buněčném typu a je dán souhrou řady faktorů, jako je například přítomnost homologního templátu. HR je vysoce přesný mechanismus, jelikož k opravě jako předlohu využívá homologních sekvencí sesterských chromatid v S a G2 fázi buněčného cyklu, které zůstávají v těsné blízkosti templátových vláken do doby segregace v anafázi. Na rozdíl od HR, která vyžaduje dlouhý homologní úsek, NHEJ stačí pro přesné spojení krátké homologie přecházejících konců, ale i v případě absence kompatibility konců je reakce katalyzována. Byly popsány vzájemné interakce mezi faktory obou mechanismů, kdy v savčích buňkách mohou proteiny podílející se na NHEJ ovlivňovat taktéž HR (Shrivastav *et al.* 2008). U vyšších organismů, včetně člověka, je NHEJ dominantním mechanismem reparace DNA, zatímco HR probíhá s vysokou procesivitou pouze v průběhu S a G2 fáze.

Mezi proteiny, které modulují mechanismy oprav DNA a spojují je s řízením buněčného cyklu a apoptózy, patří i kinázy ATM a Chk2, zodpovědné za aktivaci transkripčního faktoru p53. Význam jejich funkce je patrný zejména v případech alterací nebo úplné absence těchto proteinů, kdy může být výrazně narušena homeostáza buňky vedoucí až k její nádorové transformaci. Řada autorů, jako např. Bartková *et al.* (2005) se domnívají, že osa ATM-Chk2-p53 je rozhodujícím faktorem v tumorigenezi především solidních nádorů. Poukazují na skutečnost, že aktivované formy ATM a Chk2 jsou přítomny ve většině pre-invazivních stádií nádorů u člověka, kdy k aktivaci této signální dráhy dochází ještě dříve, než se viditelně projeví poruchy a nestabilita genomu doprovázená její následnou poruchou.



Obr. 1. Schéma naznačující sled událostí vedoucích k přeměně buňky na nádorovou a mechanismus, kterým se této přeměně buňka brání. (Převzato z Lilley & Weitzman, 2010)

2 Struktura genu *CHEK2* a jeho proteinového produktu

2.1 Identifikace checkpoint kinázy 2

Pro studium signálních drah zajišťujících opravy genomové DNA byly důležité experimenty na jednoduchých modelových eukaryontních organizmech, zvláště kvasinkách. Na základě těchto experimentů charakterizujících jednotlivé proteiny DNA-reparačních drah, byla následně různými postupy identifikována řada jejich lidských homologů.

Takovýmto postupem byl identifikován protein regulující kontrolní bod v G2 fázi Chk1 (Sanchez *et al.* 1997, Peng *et al.* 1997). Následně se však ukázalo, že Chk1 není schopen zastat úlohu aktivačního faktoru inhibice buněčného cyklu při poruše replikace. Matsuoka *et al.* (1998) hledali lidský protein s tímto potenciálem na základě studia homologních sekvencí s protein kinázami Rad53 u *Saccharomyces cerevisiae* a Cds1 u *Schizosaccharomyces pombe*, které jsou součástí signální dráhy kontrolního bodu v G1 fázi a odpovědi na poškození DNA při poruše replikace. Porovnáním sekvencí genů kináz kvasinek s databází lidských sekvencí byl identifikován savčí homolog Chk2 (Matsuoka *et al.* 1998) kódovaný lidským genem *CHEK2*.

Na základě výsledků Matsuoky *et al.* (1998) bylo komplementačním testem zjištěno, že buňky kvasinek s letální inaktivací genu *RAD53* byly schopny vytvářet kolonie, pokud expimovaly na plazmidu vnesený lidský gen *CHEK2*. Při poškození DNA a zástavě replikace je Rad53 fosforylován (Sanchez *et al.* 1996). Stejnou modifikaci v závislosti na ionizačním záření vykazoval i Chk2 a to účinkem kinázy ATM (Chaturvedi *et al.* 1999; Matsuoka *et al.* 1998). Aktivovaný Chk2 následně fosforyluje protein Cdc25C, čímž mu brání v aktivační defosforylaci komplexu Cdc2 s cyklinem B, a tím vstupu buňky do M-fáze buněčného cyklu. Chk2 fosforyluje Cdc25 na Ser-216 stejně jako Chk1, což naznačuje překrývající se funkce těchto kináz (Chaturvedi *et al.* 1999; Matsuoka *et al.* 1998). Chk2 také může částečně zastat funkci Cds1 u buněk s defektním genem *CDS1* vystavených působení hydroxymočoviny. Aktivace Chk2 je však v tomto případě nezávislá na aktivitě ATM. (Brown *et al.* 1999; Chaturvedi *et al.* 1999)

2.2 Lidský gen *CHEK2*

Gen *CHEK2* (OMIM 604373) je lokalizován v oblasti q12.1 lidského chromozomu 22, kde probíhá ve směru reverzního vlákna DNA a zabírá úsek 54,7 kb. Oblast genu odpovídající posledním čtyřem kódujícím exonům s přilehlými intronovými úseky

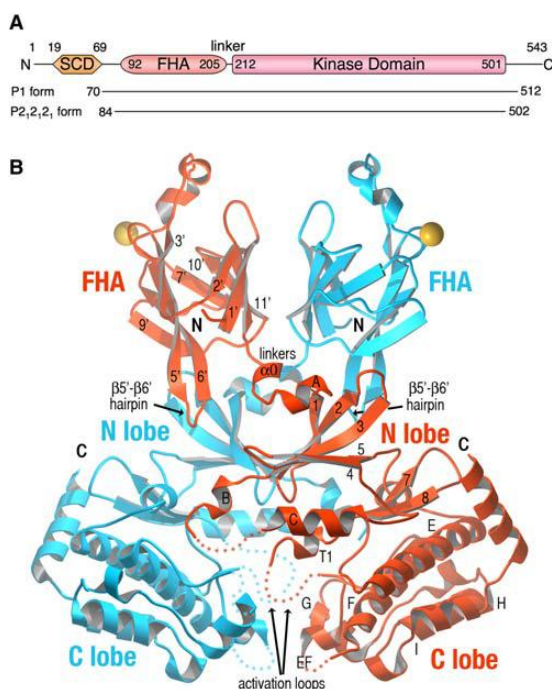
se v lidském genomu vyskytuje v podobě řady pseudogenů komplikujících genetická vyšetření.

V dominantně exprimované sestřihové variantě CHEK2 A mRNA obsahuje 15 exonů, z toho 14 kódujících. Kromě této bylo popsáno mnoho dalších sestřihových variant. Staalesen *et al.* (2004) našli u 53 pacientů s karcinomem prsu 90 různých mRNA CHEK2, kdy jako nejčastější událost uvedli ztrátu celých exonů. Alternativní/aberantní sestřihové varianty CHEK2 mRNA se ve všech zkoumaných nádorech vyskytovaly společně s WT CHEK2 a taktéž se vyskytovaly i ve vzorcích zdravé tkáně. V analyzovaných nádorových buňkách však byly nalezeny některé nové sestřihové varianty a jejich celkový výskyt byl vyšší, než v buňkách nenádorových.

2.3 Struktura CHK2 proteinu

Protein Chk2 obsahuje 543 aminokyselin vytvářejících tři vysoce konzervativní proteinové domény (Matsuoka *et al.* 1998). Sekvence lidského Chk2 je z 26 % identická s kvasinkovými homology Rad53 i Cds1, v dalších 30 % je s nimi podobná. Nejvíce příbuzný je myšimu proteinu Chk2. Chk2 patří do rodiny serin/treoninových protein kináz (EC 2.7.11.1).

Molekuly Chk2 při své aktivaci přechodně vytváří dimery, ve kterých jsou protomery vzájemně propleteny přes krátkou spojku (Obr. 2) (Cai *et al.* 2009).

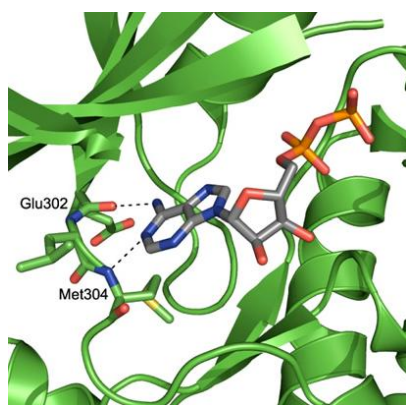


Obr. 2. A) Vyznačení domén v proteinu Chk2. Postupně od N-konce k C-konci Chk2 obsahuje SCD doménu (SQ/TQ cluster domain), FHA doménu (forkhead-associated domain) a kinázovou doménu (P1 a P2,2,2 označují části polypeptidového řetězce, které se podařilo připravit pro krystalografické analýzy).

B) Schéma dimeru proteinu Chk2. Molekuly Chk2 jsou v dimeru složeného ze dvou protomerů (modře a červeně) vzájemně propleteny. N-koncová a C-koncová část protomerů vytvářejí zářez, v němž se nachází vazebné místo pro ATP. V oblasti FHA domény každé molekuly je vázán hořčičnatý kationt. Šipky ve spodní části ukazují na aktivační smyčky. (Převzato z Cai *et al.* Mol Cell 2009)

N-koncová doména je tvořena opakujícím se motivem párů serin - glutamin a threonin - glutamin (tzv. SQ/TQ cluster domain – SCD). V proteinovém řetězci tuto doménu tvoří aminokyselinové zbytky 19 – 69 (Cai *et al.* 2009) a zahrnuje funkčně důležitý threonin 68. Dále následuje fosfoproteinový interakční modul tzv. „forkhead-associated“ (FHA) doména, která je tvořena aminokyselinami 92 – 205. FHA doména Chk2 sestává z 11 β -řetězců tvořících těsnou skupinu, kdy z jedné strany je vazebné místo pro fosfothreonin (Li *et al.* 2002). Mutace v těchto místech pravděpodobně destabilizují strukturu proteinu (Ahn *et al.* 2002). Threonin, který je vázán FHA doménou se vyskytuje v oblasti SCD domény na pozici 68 aminokyselinového řetězce a je cílem fosforylace kinázou ATM (Matsuoka, 1998). Druhá strana skupiny β -řetězců obsahuje vlásenku, se kterou v dimeru společně interaguje s N-částí kinázové domény druhé molekuly Chk2 (Cai *et al.* 2009).

Podstatnou část proteinu až k C-koncové oblasti (aminokyseliny 212 – 501) zabírá serin/threoninová kinázová doména (KD) (Matsuoka *et al.* 1998). ATP-vazebné místo kinázové domény (Obr. 3) se nachází v zářezu, který svým uspořádáním vytvářejí její N-koncová a C-koncová část, kde N-koncová část vytváří β -strukturu, zatímco delší C-koncová část je tvořena převážně α -helixy a obsahuje aktivační smyčku kinázy (aminokyselinové zbytky 371 – 391).



Obr. 3. Vazba ADP na molekulu Chk2 (PDB ID: 2CN5). Vodíkové můstky zprostředkávající interakci ADP s Glu302 a Met304 kinázové domény jsou naznačeny čárkovaně. (Převzato z Matijssen *et al.* 2012)

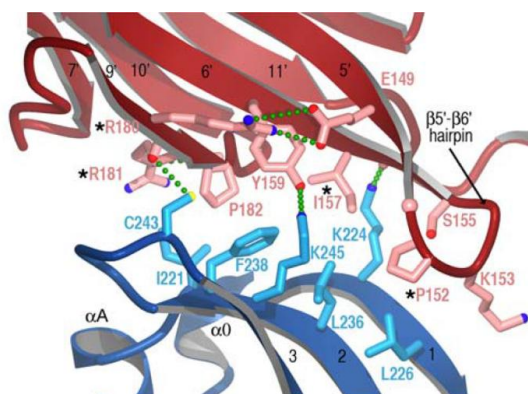
Sekvence aminokyselin v úseku 515 – 522 vytváří jaderný lokalizační signál určující transport Chk2 do jádra (Zannini *et al.* 2003). Tuto signální sekvenci rozpoznává protein karyopherin- α 2, který pomocí své C-koncové části váže Chk2 a translokuje jej v komplexu s karyopherinem- β 1 do jádra. Mutace jaderného lokalizačního signálu Chk2 způsobí, že není rozpoznán pro transport a zůstává v cytoplazmě.

3 Regulace kinázové aktivity proteinu Chk2

3.1 Aktivace Chk2

Hlavním regulačním signálem pro aktivaci/inaktivaci Chk2 je jeho fosforylace. Aktivaci proteinu Chk2 zajišťuje kináza ATM. Tato serin/threoninová kináza o velikosti 3056 aminokyselin se řadí do rodiny fosfatidylinositol-3-kináz (PI3K-like protein kinases; PIKKs). Protein ATM je důležitou součástí buněčných odpovědí na poškození ionizujícím zářením a podílí se na kontrole buněčného cyklu. ATM, podobně jako ATR (Ataxia-telangiectasia and Rad3-related), rozeznává u svých substrátů aminokyselinový motiv, ve kterém po serinu či threoninu následuje glutamin (Kim *et al.* 1999; O'Neill *et al.* 2000). V přítomnosti dvouřetězcových zlomů DNA vznikajících např. působením ionizačního záření, dochází k fosforylaci Chk2 (Matsuoka *et al.* 1998). Aktivace Rad53 a Cds1v *Saccharomyces cerevisiae* respektive *Schizosaccharomyces pombe* závisí na jejich homolozích ATM. Matsuoka *et al.* (1998) prokázal regulaci Chk2 pomocí ATM pokusy s buňkami, které ATM postrádaly a s buňkami, kde bylo ATM vpraveno pomocí expresního vektoru. Jak bylo uvedeno výše, v buňkách bez ATM nedocházelo k žádné modifikaci Chk2, avšak indukce exprese ATM z vektoru zajistila aktivační fosforylaci a v jejím důsledku kinázovou aktivitu Chk2.

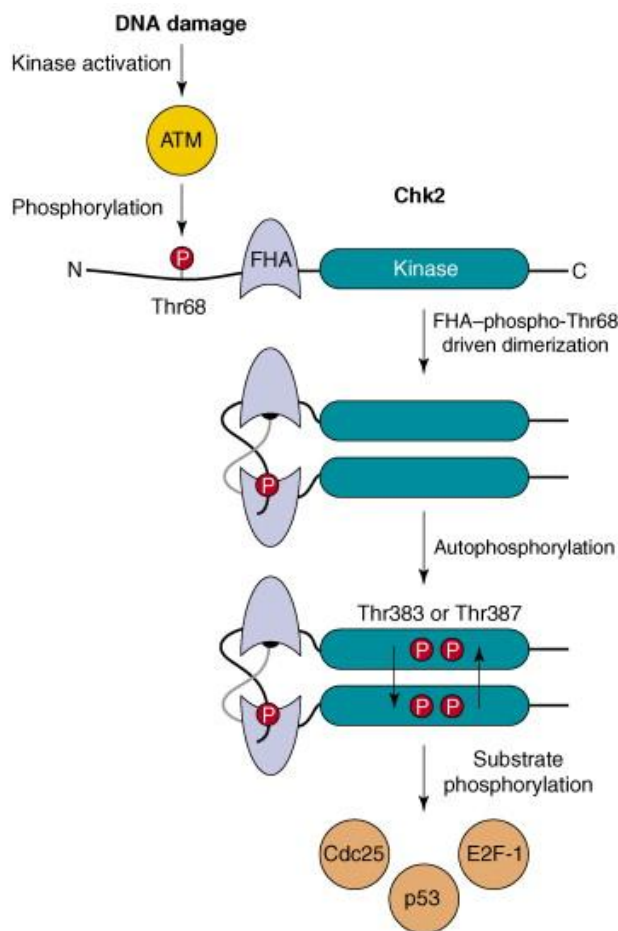
V lidských buňkách aktivovaná kináza ATM fosforyluje protein Chk2 na Thr68 v oblasti SCD domény. K aktivaci Chk2 po vystavení buňky ionizačnímu záření samotná fosforylace Thr68 nestačí (Ahn *et al.* 2000), je však nezbytná pro následnou dimerizaci protomerů Chk2 (Obr 4) a fosforylaci Thr383 a Thr387 lokalizovaných v aktivační smyčce jejich kinázových domén¹.



Obr. 4. Schéma interakce protomerů Chk2 prostřednictvím FHA domény jedné molekuly (červeně) s kinázovou doménou druhého řetězce homodimerů (modře) v průběhu aktivace Chk2. Mutace v aminokyselinových zbytcích označených (*) byly identifikovány u pacientů s nádorovými onemocněními. (Převzato z Cai *et al.* Mol Cell, 2009)

¹ Postup fosforylace klíčových aktivačních zbytků Thr383 a Thr387 není zcela objasněn. Zatímco Lee a Chung (2001) se domnívají, že je zajištěna autofosforylací, Schwarz *et al.* (2003) ukazují, že dochází k transfosforylaci. Tato teorie v posledních letech dominuje (Oliver *et al.* 2007) a podporuje ji i práce Schwarzové *et al.* (2003), která dokládá, že aktivace Chk2 je možné dosáhnout i bez ionizačního záření nezávisle na ATM, a to nadprodukcí proteinu v bakteriích nebo savčí tkáňové kultuře. (Schwarz *et al.* 2003).

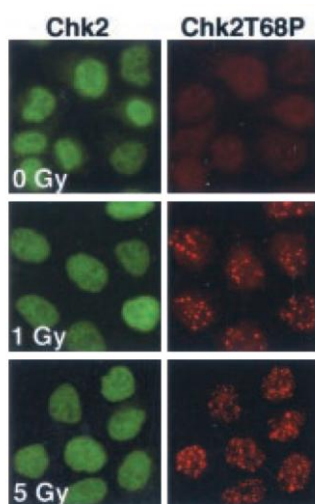
Tyto aminokyselinové zbytky jsou evolučně konzervovány i v kvasinkových homolozích Cds1 a Rad53. Jejich výměna za alanin vedla k výraznému snížení kinázové aktivity proteinu v odpovědi na ionizační záření (Lee *et al.* 2001). Fosforylací Thr383 a Thr387 dochází ke konformační změně v oblasti T-kličky katalytického centra kinázové domény, která naruší další vazby udržující dimer a vyústí v disociaci katalyticky plně aktivních molekul Chk2 (Cai *et al.* 2009). Plně aktivovaná molekula kinázy Chk2 katalyzuje aktivaci dalších molekul, kdy zatím nefosforylovaná molekula Chk2 se prostřednictvím své FHA domény váže na fosfoThr68 aktivovaného Chk2. Tato interakce, zprostředkovaná kontakty mezi SCD a FHA doménami, je důležitá pro vytvoření dimeru, ve kterém pak dochází k transfosforylaci a následné aktivaci druhé molekuly (Xu *et al.* 2002)². Po vzájemné fosforylaci molekul Chk2 v dimeru, jsou následně uvolněny aktivní monomery (Ahn *et al.* 2002).



Obr. 5. Schéma aktivace kinázové aktivity Chk2 fosforylací ATM v odpovědi na ionizační záření. Na obrázku je znázorněn koncept aktivační transfosforylace, kdy po úvodní aktivaci (fosforylaci Thr68) Chk2 protomeru kinázou ATM dochází ke konformační změně v oblasti FHA domény umožňující dimerizaci. V dimerní podobě vzájemně interagují kinázové domény obou protomerů a vzájemně fosforylují threoniny 383 a 387, které se nacházejí v oblasti aktivační T-kličky. Výsledkem je plná aktivace Chk2 umožňující fosforylaci cílových proteinů (Cdc25A/C, p53, či E2F-1). (Převzato z Oliver *et al.* 2007)

² Avšak i při absenci fosforylace SCD domény je protein schopen vytvářet dimery (Cai *et al.* 2009). Děje se tak prostřednictvím FHA domény nebo na základě interakce FHA a kinázové domény protomerů. Interakce dimerů vytvořených nezávisle na SCD doméně je však spíše přechodná a podporuje vazbu přes pThr68. Větší stabilita těchto vazeb by totiž mohla vyvolávat nežádoucí aktivaci proteinu.

V závislosti na dávce ionizačního záření se množství aktivovaných molekul proteinu Chk2 zvětšuje, avšak jeho celkové množství se v buňce příliš nemění. Zvyšující se dávky ionizačního záření zapříčiňují fosforylaci Thr68 u většího množství molekul Chk2, s čímž také koreluje celková vyšší kinázová aktivita Chk2, což se dá dokázat fosforylací jeho přirozeného substrátu, proteinu Cdc25C. (Ward *et al.* 2001) Pomocí nepřímé imunofluorescence autoři rovněž zaznamenali, že v nepoškozených buňkách byl Chk2 volně rozptýlen a molekuly Chk2, ve kterých byl fosforylován Thr68 se vyskytovaly minimálně, spíše vůbec. V řádu několika minut po ozáření buněk se molekuly Chk2 v jádře shlukovaly, a to v oblasti dvouřetězcových zlomů DNA, kde kolokalizovaly s reparačním proteinem 53BP1 (Obr. 6). Porovnáním wild-type buněk s buňkami deficientními v genu pro ATM byla prokázána závislost Chk2 na přítomnosti této kinázy, kdy se při její absenci molekuly Chk2 neshlukovaly.



Obr. 6. Fosforylace kinázy Chk2 po aplikaci ionizačního záření v dávce 1 a 5 Gy. Ionizační záření způsobuje vznik dvouřetězcových zlomů genomové DNA, které se projevují jako shluky DNA reparačních proteinů (reparační ohniska, foci). V těchto shlucích se vyskytuje i aktivovaná forma Chk2 (fosforylovaná na Thr68; Chk2T68P). (Převzato z Ward *et al.* 2001)

Jako další místo, jež je fosforylováno v závislosti na ionizačním záření, byl identifikován serinový zbytek v pozici 516 (Schwarz *et al.* 2003). Jelikož je autofosforylován, je pro jeho modifikaci vlastní kinázová aktivita Chk2 nezbytná (Schwarz *et al.* 2003; Wu *et al.* 2003). Schwarz *et al.* (2003) však neprokázali, že by Ser516 (na rozdíl od Thr383 a Thr387) byl podmínkou pro plnou aktivaci Chk2, neboť kinázová aktivita mutanty nesoucí v této pozici alanin namísto serinu nevykazovala v porovnání s WT Chk2 výraznou odlišnost. K opačnému závěru došli Wu a Chen (2003), kteří v pokusech s proteinem nesoucím stejnou mutaci, zaznamenali v porovnání s WT proteinem pokles kinázové aktivity vůči substrátu Cdc25C. Identifikovali Ser516 jako důležitý faktor v aktivaci Chk2 a také v apoptotické dráze vyvolané ionizačním zářením, na které se Chk2 podílí nezávisle na p53.

3.2 Inaktivace Chk2

Obnova buněčného cyklu po jeho zastavení v rámci oprav dvouřetězcových zlomů DNA je zajišťováno u *Saccharomyces cerevisiae* fosfatázami Ptc2 a Ptc3 z rodiny proteinfosfatáz typu 2C (PP2C), které defosforylují a tím inhibují negativní regulátor buněčného cyklu Rad53 (Leroy *et al.* 2003). Jelikož jsou mechanismy buněčného cyklu a jeho kontrolních bodů mezi organizmy velmi konzervovány, Leroy *et al.* (2003) se domnívali, že lidský homolog z rodiny PP2C fosfatáz bude patrně inaktivovat lidský homolog Rad53 – kinázu Chk2.

Kandidátem na tuto funkci byl Wip1, jelikož bylo známo, že je vysoce exprimován po vystavení buněk ionizačnímu záření (Fiscella *et al.* 1997). Fujimoto *et al.* (2006) zjistili, že Wip1 skutečně interaguje s Chk2, defosforyluje jeho Thr68, čímž působí jako jeho negativní regulátor v odpovědi na poškození DNA. Oliva-Trastoy *et al.* (2007) zjistili, že Wip1 váže Chk2 v extraktech z ozářených, nikoli však intaktních, buněk, tedy že Wip1 interaguje preferenčně s aktivovanou formou Chk2. Nadto prokázali, že defosforylace Thr68 pomocí Wip1 u plně aktivované formy Chk2, kdy jsou již fosforylovány Thr383 a Thr387 v oblasti aktivační smyčky, neovlivní kinázovou aktivitu Chk2, jelikož tyto aminokyselinové zbytky nedokáže defosforylovat. Wip1 svou fosfatázovou aktivitou vůči Chk2 působí proti vlivu ATM, se kterým kompetuje o fosforylaci Thr68. Wip1 nepůsobí tak, že by defosforyloval aktivované molekuly Chk2 v době, kdy má buněčný cyklus pokračovat, ale působí již v časně fázi odpovědi na ionizační záření a ovlivňuje možnost ATM fosforylovat Chk2 (Lindqvist *et al.* 2009). Míra aktivity Wip1 reguluje aktivaci Chk2 a dobu, po kterou je zastaven buněčný cyklus v G2 fázi. Nezbytné a zároveň dostačující provzájemnou interakci molekul jsou SCD doména kinázy Chk2 a N-koncová část fosfatázy Wip1 (Yoda *et al.* 2006). Dále je také důležitá vlastní kinázová aktivita Chk2 a jaderný lokalizační signál, jelikož k interakci proteinů dochází v buněčném jádře. Imunofluorescenční analýzou buněk po vystavení ionizačnímu záření Yoda *et al.* (2006) detekovali shlukování fosforylovaných molekul Chk2 v místech reparačních ohnisek při opravách dvouřetězcových zlomů DNA. V přítomnosti fosfatázy Wip1 byl zaznamenán úbytek těchto shluků dokumentující negativní regulaci Chk2 fosfatázou Wip1. Mutanty Wip1, kterým chybí fosfatázová doména nebo se skládají pouze z N-koncové domény, vykazují dominantně negativní chování v regulaci Chk2 a brání WT protein fosfatázám v defosforylaci pThr68.

Kromě Chk2 Wip1 defosforyluje řadu dalších fosfoproteinů angažovaných v regulaci buněčného cyklu a odpovědi na poškození DNA včetně kinázy ATM. V jejím proteinovém řetězci defosforyluje Ser1981, který je klíčovým faktorem pro aktivaci ATM, čímž Wip1

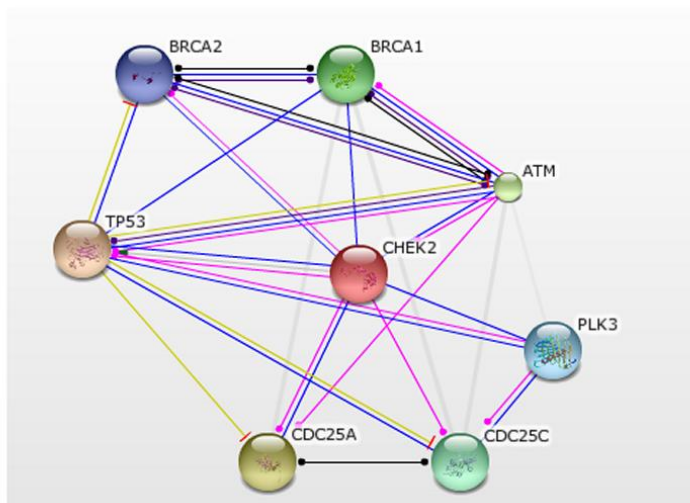
ovlivňuje úlohu ATM v regulaci jejích substrátů jako je právě Chk2. V experimentech Shreeram *et al.* (2006) způsobila indukce exprese Wip1 v buňkách pokles míry fosforylace ATM po ionizačním záření. Naopak v případě nedostatku fosfatázy Wip1 bylo ATM fosforylováno ve větším rozsahu. Množství a aktivita Wip1 nastavuje určitý práh nejen pro možnost aktivace ATM, ale i širší odpovědi na poškození DNA (Macurek *et al.* 2013). Po poškození DNA zůstává Wip1 s ATM asociován, čímž je ovlivněna kaskáda, kterou ATM dále spouští. Sama absence této protein fosfatázy však úplnou aktivaci ATM nezpůsobí.

4 Substráty kinázové aktivity Chk2 a jejich význam v intracelulární signalizaci

Úkolem kinázy Chk2 je amplifikace signálu v odpovědi na genotoxické poškození. Hlavním regulátorem této dopovědi je tumor supresorový protein p53, který je i patrně nejvýznačnějším substrátem kinázové aktivity Chk2. Kromě p53 však Chk2 na základě fosforylace reguluje i další důležité substráty účastníci se řízení buněčného cyklu a reparace DNA.

Pro zjištění fyziologické role Chk2, Takai *et al.* (2002) zkoumali následky deficiencie v genu *CHEK2* u myši. Na rozdíl od produktu genu *CHEK1*, jehož absence je letální, u jedinců s fenotypem *Chk2*^{-/-} nebyly po narození pozorovány výrazné odlišnosti od jedinců *Chk2*^{+/-} a *Chk2*^{+/+}. Jelikož absence kinázy ATM v buňkách způsobuje jejich vysokou citlivost k ionizačnímu záření, bylo předpokladem, že nepřítomnost Chk2, jakožto substrátu ATM, bude mít podobné následky. U myši *Chk2*^{+/-} a *Chk2*^{+/+} se po ozáření postupem vyvíjela poškození, která vedla do 14 dnů k jejich smrti, naopak *Chk2*^{-/-} jedinci vykazovaly vůči ionizačnímu záření vyšší odolnost a přežívali až 30 dnů od ozáření. Zjistili, že absence Chk2 zajistila buňkám sleziny a oblasti mozku, které jsou za normálních okolností vysoce citlivé k působení ionizačního záření a následné apoptóze, zvýšenou radiorezistenci. Apoptóza těchto buněk je závislá na funkci p53, pro jehož fosforylaci a stabilizaci je Chk2 postradatelný, jelikož p53 je fosforylován také kinázou Chk1, ATM nebo ATR. Pro transkripční aktivaci p53, která spouští expresi proapoptických genů v odpovědi na ionizační záření, je Chk2 naopak patrně nezbytný. Některé substráty Chk2 jsou společné i kináze Chk1, která tak může částečně zastoupit jeho funkci.

V průběhu posledních let bylo identifikováno několik substrátů Chk2, které patří do skupiny proteinů propojujících regulaci buněčného cyklu, apoptózu a reparaci DNA (Obr. 7).



Your Input:

- CHEK2 CHK2 checkpoint homolog (*S. pombe*); Regulates cell cycle checkpoints and apoptosis in response to DNA damage, particularly to DNA double-strand breaks. Inhibits CDC25C phosphatase by phosphorylation on 'Ser-216', preventing the entry into mitosis. May also play a role in meiosis. Regulates the TP53 tumor suppressor through phosphorylation at 'Thr-18' and 'Ser-20' (586 aa) (*Homo sapiens*)

Predicted Functional Partners:

		Activation	Binding	Post-transl. m	Score
●	TP53	tumor protein p53; Acts as a tumor suppressor in many tumor types; induces growth arrest or apo [...]	(393 aa)	● ● ●	0.999
●	CDC25A	cell division cycle 25 homolog A (<i>S. pombe</i>); Tyrosine protein phosphatase which functions as a [...]	(524 aa)	● ● ●	0.999
●	ATM	ataxia telangiectasia mutated; Serine/threonine protein kinase which activates checkpoint signa [...]	(3056 aa)	● ● ●	0.999
●	BRCA1	breast cancer 1, early onset; The BRCA1-BARD1 heterodimer coordinates a diverse range of cellu [...]	(1863 aa)	● ● ●	0.999
●	CDC25C	cell division cycle 25 homolog C (<i>S. pombe</i>); Functions as a dosage-dependent inducer in mitotic [...]	(473 aa)	● ● ●	0.999
●	PLK3	polo-like kinase 3 (<i>Drosophila</i>); Serine/threonine protein kinase involved in regulating M phase [...]	(646 aa)	● ● ●	0.984
●	BRCA2	breast cancer 2, early onset; Involved in double-strand break repair and/or homologous recombina [...]	(3418 aa)	● ● ●	0.981

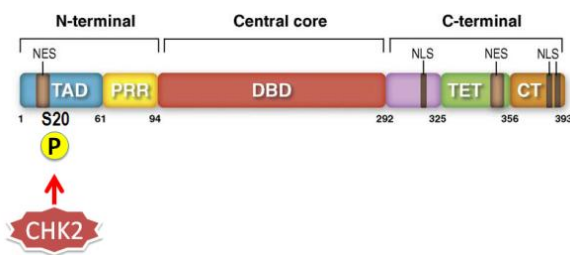
Obr. 7. Predikce interakčních partnerů kinázy kódované genem CHEK2 pomocí nástroje STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins; <http://string.embl.de>).

4.1 Transkripční faktor p53

Gen *TP53* (Transformation-related protein 53) kóduje produkt p53. Protein p53 je transkripčním faktorem, jenž hraje zásadní roli v reakcích buňky na stres a dle typu a míry poškození poté spouští odpověď v podobě transkripce cílových genů. Jejich produkty se podílejí na zástavě buněčného cyklu (p21^{waf1/cip1/CDKN1A}) nebo indukci apoptózy (Bax, PUMA, Noxa) v případě ireverzibilních poškozeních genomové DNA nebo při dlouhotrvající aberantní onkogenní stimulaci.

Za normálních okolností, kdy není buňka porušena, je p53 udržován pomocí proteinu Mdm2 neaktivní. Mdm2 (Mouse double minute 2 homolog) je E3-ubiquitin protein ligáza, jež polyubiquitinylací modifikuje p53, který je následně degradován v proteasomu. Naopak je tomu v poškozených buňkách, kdy je p53 stabilizován posttranslačními modifikacemi, čímž zajišťuje následnou odpověď na dané poškození.

Aktivovaný Chk2 v odpovědi na poškození DNA fosforyluje Ser20 p53 (Obr. 8; Hirao *et al.* 2000; Chehab *et al.* 2000). Fosforylace právě tohoto aminokyselinového zbytku oslabuje vazbu mezi p53 a Mdm2, a dochází k disociaci komplexu (Chehab *et al.* 1999). Stabilizace p53 pak vede k zastavení buněčného cyklu v kontrolním bodě G1. Chehab *et al.* (1999) vpravili do buněk expresní vektor s genem *CHEK2* sledovali účinek Chk2 na endogenní p53 v odpovědi na poškození DNA. Ve své práci dospěli k závěru, že se Chk2 podílí na zastavení buněčného cyklu v kontrolním bodě G1 přes stabilizaci p53. Jack *et al.* (2002) naopak tvrdí, že Chk2 je v tomto procesu postradatelný a stabilizace p53 může být regulována přímo kinázou ATM. V případě modifikace p53 pomocí ATM není fosforylován Ser20, jako je tomu pomocí Chk2, ale Ser15 (Hirao *et al.* 2000). Jack *et al.* (2002) se domnívají, že pozorování Chehab *et al.* (1999), kdy nastalo zastavení buněčného cyklu v kontrolním bodě G1, bylo způsobeno nadprodukcí Chk2, a že endogenní hladina Chk2 v buňce zastavení cyklu nezpůsobí.



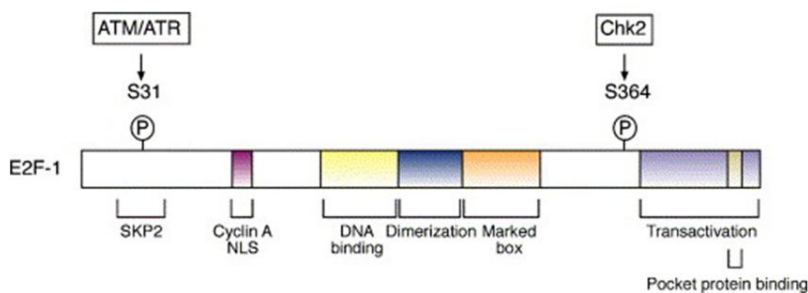
Obr. 8. Znázornění polohy Ser20 v proteinu p53, který je fosforylován kinázou Chk2 v oblasti transaktivační domény (TAD). (Upraveno podle Amaral *et al.* 2009)

4.2 Transkripční faktor E2F-1

E2F-1 je transkripční faktor, jehož aktivace může vést k transkripci genů podílejících se jak na proliferaci buněk, tak jejich apoptóze. Posttranslační modifikace a faktory, které se na něj vážou určují, zda bude mít aktivační nebo inhibiční funkci. E2F-1 se nemusí nutně chovat pouze jako transkripční faktor, bylo zjištěno, že se také podílí na odpovědi na poškození DNA vyvolané ultrafialovým a ionizačním zářením nebo chemoterapeutickými látkami. (Biswas & Johnson, 2012)

C-koncová část proteinového řetězce E2F-1 obsahuje podobnou sekvenci, jež se nalézá v substrátech Chk2 (Stevens *et al.* 2003). V pokusech Stevense *et al.* (2003) byl pro poškození DNA použit etoposid, inhibitor topoisomerázy II, jehož účinkem dochází k poruchám replikace za vzniku dvouřetězcových zlomů v DNA. Jako místo, které je v souvislosti s poškozením DNA kinázou Chk2 fosforylováno byl identifikován Ser364 (Obr. 9). Regulace

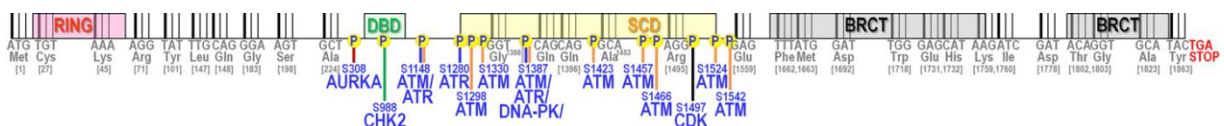
pomocí Chk2 spočívá v prodloužení doby poločasů rozpadu E2F-1 díky fosforylaci, která zvyšuje jeho stabilitu a následně účinnost transkripce.



Obr.9. Schéma transkripčního faktoru E2F-1 s vyznačenými místy fosforylace kinázami Chk2 (Ser368) a ATM/ATR (Ser31). (Převzato z Stevens *et al.* 2004)

4.3 Tumor supresorový protein BRCA1

Protein BRCA1, breast cancer type 1 susceptibility protein, se podílí na opravě poškozené DNA a tak na zachování integrity genomu. BRCA1 sehrává roli důležitého protein-proteinového modulačního a platformního elementu, na který v případě přítomnosti dvouřetězcových zlomů v DNA asociují další reparační faktory, a který se spolupodílí na výběru reparační dráhy (NHEJ vs. HR). Důležitost produktu genu *BRCA1* dokazují případy, kdy jeho mutace vedou ke zvýšenému výskytu nádorů, zejména prsu a ovarií. Funkce proteinu je regulována posttranslačními modifikacemi, především fosforylacemi, které ovlivňují také interakce s dalšími proteiny a jeho lokalizaci v buňce (Obr. 10).



Obr. 10. Schéma primární sekvence proteinu BRCA1 s vyznačením míst jeho fosforylace a fosforylujících kináz (modře). V oblasti DNA-vazebné domény (DBD) se nachází Ser988, který Chk2 fosforyluje. Na N-konci se nachází ubiquitylační RING finger doména, kterou BRCA1 asociuje se svým stabilním vazebným partnerem, proteinem BARD1. Obvyklými místy pro fosforylaci jsou seriny lokalizované v oblasti bohaté na tyto aminokyseliny (SCD). Na C-konci se pak nachází stejnojmenné domény (BRCT) zprostředkovávající protein-proteinové interakce. (Upraveno podle (Sevcik *et al.* 2012)

Ionizační záření spouští kaskádu, ve které ATM aktivuje kinázu Chk2, jež dále fosforyluje Ser988 BRCA1 (Lee *et al.* 2000). Fosforylace Ser988 kinázou Chk2 nejspíše způsobí konformační změnu v molekule BRCA1, která se podílí na upřednostnění HR před NHEJ při opravě dvouřetězcových zlomů DNA (Zhang *et al.* 2004).

V průběhu mitózy je protein BRCA1 asociován s centrosomem, útvarem, jenž zajišťuje ukotvení dělicího vřeténka pro přesné rozdělení genetického materiálu do dceřiných buněk (Hsu *et al.* 1998). Centrosomální alterace, které mohou dále vyústit v chromosomální aberace, jsou u nádorových buněk častým jevem. BRCA1 hraje roli v regulaci počtu centrosomů v buňce, kdy ubiquitynylační aktivita BRCA1 proti γ -tubulinu ruší kontakt mikrotubulinových vláken mitotického vřeténka s centrosomem a inhibuje jeho nukleační aktivitu (Sankaran *et al.* 2005). Poškození mitotického vřeténka vyvolá fosforylaci BRCA1 na Ser988, jeho shlukování kolem centrosomu a následnou inhibici nukleace. Zdá se, že za tuto fosforylaci je zodpovědný Chk2, jelikož je při této odpovědi modifikován jeho aktivační Thr68 (Chabaliere-Taste *et al.* 2008).

4.4 Fosfatázy Cdc25A, Cdc25C

Rodina duálně-specifických protein fosfatáz Cdc25 se významně podílí na regulaci buněčného cyklu tím, že aktivují komplexy cyklinů a cyklin-dependentních kináz, které regulují postup buněčného cyklu. Cdc25 fosfatázy jsou také součástí odpovědi na poškození DNA, které je detekováno proteiny kontrolních bodů. V savčích buňkách se vyskytují 3 isoformy – Cdc25A, Cdc25B a Cdc25C, které mají obdobné mechanismy funkce, avšak jejich role v regulaci buněčného cyklu, jakožto i jejich lokalizace v buňce a časová aktivace jsou specifické. Aktivita Cdc25B a Cdc25C je omezena na přechod z G2 do M fáze, kdy oba proteiny fungují v iniciaci mitózy jiným způsobem (Karlsson *et al.* 1999). Cdc25B a Cdc25C fosfatázy odejímají fosfát kináze Cdk1 v komplexu s cyklinem B (MPF), který je fosforylací udržován v neaktivním stavu mimo buněčné jádro, a jehož defosforylace vede buňku do úvodní fáze mitózy. V závislosti na fázi probíhajícího buněčného cyklu je substrátem aktivované kinázy Chk2 fosfatáza Cdc25A (na přechodu G1-S) a Cdc25C (na přechodu G2-M; Obr. 11).

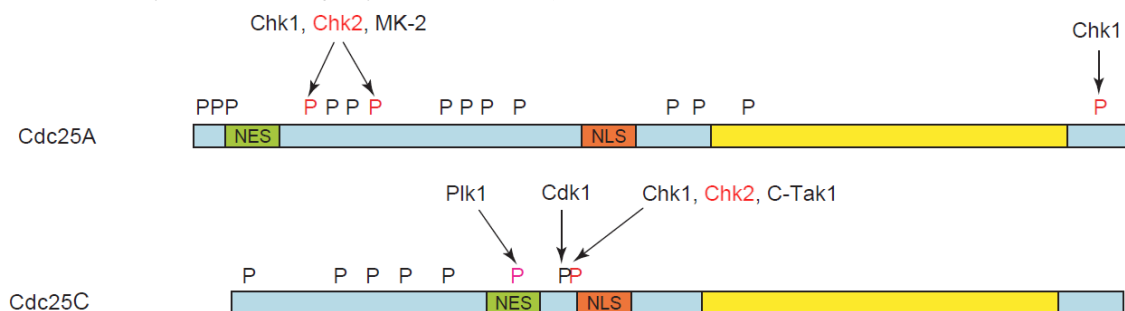
Roli **Cdc25C** v defosforylaci Cdk1s cyklinem B naznačily pokusy, ve kterých byla aktivita Cdc25C inhibována vanadátem, jakožto inhibitoru tyrosinových fosfatáz (Blasina *et al.* 1999). Samotná Cdc25C fosfatáza je aktivována svým vlastním substrátem komplexem Cdk1–cyklin B, čímž je vytvořena pozitivní smyčka (Hoffmann *et al.* 1993).

Blasina *et al.* (1999) pozorovali výrazné snížení aktivity Cdc25C vůči komplexu Cdk1 s cyklinem B vlivem ionizačního záření. Pomocí wortmanninu, jenž inhibuje kinázy rodiny PIKK (Wymann *et al.* 1996), byla propojena dráha regulovaná ATM s Cdc25C, kdy inhibice ATM výrazně omezila normálně pozorované snížení aktivity Cdc25C jako odpověď

na poškození DNA. Taktéž v buňkách deficientních v genu pro ATM nebylo možné zaznamenat snížení defosforylace Cdk1 a následné pozastavení buněčného cyklu před vstupem do mitotické fáze.

Důležitým regulačním místem v molekule Cdc25C je Ser216, jelikož mutantní formy proteinu se záměnou serinu za alanin, dovolovaly buňkám vstupovat do M fáze i přes poškození DNA ionizačním zářením nebo nedokončení replikace DNA (Peng *et al.* 1997). Kinázami, které přímo fosforylují Ser216, a tím negativně regulují aktivitu Cdc25C, jsou Chk1 a Chk2 (Matsuoka *et al.* 1998; Sanchez *et al.* 1997). Fosforylaci Cdc25C na Ser216 lze normálně detekovat v průběhu interfáze buněčného cyklu a tato modifikace vytváří vazebné místo pro protein 14-3-3 σ . Naopak při vstupu do mitotické fáze je Ser216 Cdc25C defosforylován, čímž se vazebné místo pro 14-3-3 σ protein ztrácí (Peng *et al.* 1997). Zdá se, že právě vazba proteinu 14-3-3 σ znemožňuje funkční interakci Cdc25C s Cdk1, jelikož fosforylace Ser216 spolu s přítomností navázaného 14-3-3 σ proteinu negativně koreluje s aktivitou Cdc25C v průběhu buněčného cyklu.

Obr. 11. Schéma struktury fosfatáz z rodiny CDC25, fosforylovaných kinázou Chk2. Vysoce homologní C-koncová katalytická doména je vyznačena žlutě. (Převzato z Karlsson-Rosenthal & Millar, 2006)



Cdc25A je lokalizován v jádře a během buněčného cyklu k výrazné změně v jeho distribuci nedochází (Hoffmann *et al.* 1994). Množství proteinu v průběhu buněčného cyklu kolísá (Molinari *et al.* 2000) a nejvyšší hodnoty nabývá v přechodu G1 a S (Jinno *et al.* 1994). Absence Cdc25A v buňkách vedla k zastavení buněčného cyklu na přechodu G1 a S fáze, což určilo Cdc25A jako faktor nezbytný pro iniciaci replikace DNA (Hoffmann *et al.* 1994; Jinno *et al.* 1994). Cdc25A interaguje s komplexem cdk2-cyklin E, který jej fosforyluje, čímž je Cdc25A aktivován, zpětně defosforyluje inhibiční fosfát na Cdk2 v komplexu Cdk2-cyklin E a umožňuje další postup v buněčném cyklu.

Odpovědí na poškození DNA ultrafialovým zářením je výrazné snížení fosfatázové aktivity Cdc25A, kdy je protein fosforylován kinázou Chk1 a následně silně ubiquitinylován,

což jej cílí k degradaci do proteasomu (Mailand *et al.* 2000). Následně je také snížena aktivita komplexu Cdk2-cyklin E, jelikož nedochází k defosforylaci inhibičního tyrosinu. Taktéž působení hydroxymočoviny (inhibitoru ribonukleotidreduktázy způsobující depleci dNTPs a zástavu replikace DNA), vyvolává rychlý úbytek Cdc25A a doprovodný pokles kinázové aktivity komplexu Cdk2-cyklin E (Molinari *et al.* 2000). Pokud je v buňkách, na které působí hydroxymočovina nadprodukován Cdc25A, není buněčný cyklus zastaven, buňky vstupují do S fáze a nehledě na dokončení syntézy DNA pak předčasně nastává mitóza (Molinari *et al.* 2000). Obdobně buňka odpovídá v případě působení ionizačního záření, kdy je Cdc25A fosforylován kinázou Chk2 na Ser123 (Falck *et al.* 2001). Mutantní formy Chk2 I157T nebo R145W nejsou schopny vázat a fosforylovat Cdc25A, čímž stejně jako v případě nadprodukce Cdc25A, buňka ztratí schopnost pozastavení buněčného cyklu na přechodu do S fáze a v nově syntetizované DNA se tak hromadí chyby (Falck *et al.* 2001). Aktivita Chk2 v této dráze vede k degradaci Cdc25A, jež je nezbytným krokem k inhibici syntézy DNA a poskytuje buňce čas k opravám poškození.

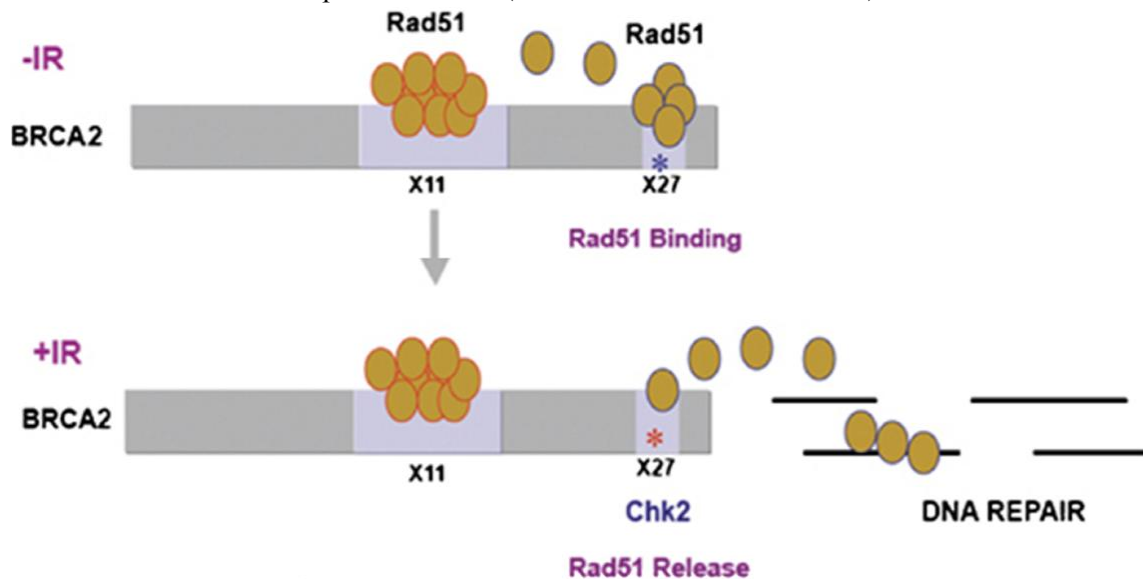
4.5 BRCA2

Obdobně jako v případě *BRCA1*, se produkt genu *BRCA2* podílí na opravách poškozené DNA, kdy hraje roli zejména při HR. Jeho vrozené mutace taktéž významně zvyšují pravděpodobnost rozvoje nádoru prsu avšak mnohem méně karcinomu ovaria. Při replikaci DNA může docházet k zastavení postupu replikační vidlice, které v normálních buňkách vede k aktivaci mechanismů oprav DNA. Pro stabilitu spojení vláken DNA v replikační vidlici je důležitý protein BRCA2, jenž tak brání zhroucení této struktury a případně následnému trvalému poškození. V experimentech s embryonálními myšimi buňkami, které obsahovaly nefunkční BRCA2 docházelo k destabilizaci zastavených replikačních vidlic doprovázené dvouřetězcovými zlomy DNA (Lomonosov *et al.* 2003).

BRCA2 prostřednictvím svého C-konce a oblasti BRC interaguje s proteinem Rad51, jenž se účastní HR a reparačních procesů DNA, kdy je translokován do jádra k místům poškození DNA v komplexu s BRCA2. V normálních buňkách jsou spolu proteiny asociovány přes obě oblasti, avšak po vystavení buněk stresu je interakce Rad51 s C-koncem přerušena a Rad51 je uvolněn. V C-koncové oblasti se nachází Thr3387 fosforylovaný kinázami Chk1 a Chk2, který umožňuje vazbu s Rad51 (Bahassi *et al.* 2008, Obr. 12). Zároveň však záměna Thr3387 za alanin znemožňuje uvolnění Rad51 od BRCA2, což může znamenat, že Thr3387 působí jako přepínač mezi uvolněním a vazbou Rad51. Zdá se, že

Chk1 se podílí na lokalizaci Rad51 k místům poškozené DNA v odpovědi na zastavení replikační vidlice způsobené UV zářením, zatímco Chk2 je upřednostněn v případě dvouřetězcových zlomů po působení ionizačního záření (Bahassi *et al.* 2008).

Obr. 12. Molekula BRCA2 poskytuje ve své struktuře dvě interakční místa pro protein Rad51. V C-koncové oblasti (kódováno exonem 27) se nalézá Thr3387, jehož fosforylace zprostředkovaná Chk2 je důležitá pro vazbu Rad51. Po indukci ionizačním zářením je protein Rad51 z tohoto místa uvolněn a podílí se na reparaci poškozené DNA. Rad51 navázaný v oblasti BRC (kódováno exonem 11) zůstává s BRCA2 asociován po celou dobu. (Převzato z Bahassi *et al.* 2008)



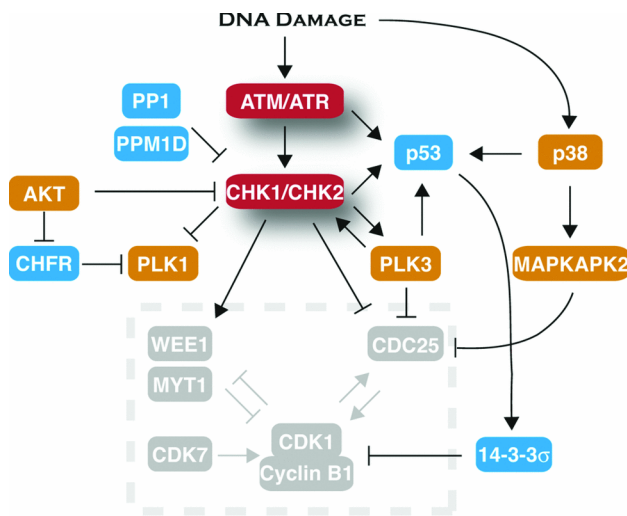
4.6 PLK3

Polo-like kinase 3 (PLK3) je serin/threoninová kináza účastnící se regulace buněčného cyklu a odpovědi na genotoxický stres. Společně s kinázou PLK1, která patří do stejné rodiny kináz, PLK3 sdílí některé své substráty, avšak jimi daná výsledná odpověď se liší a jejich aktivity fungují proti sobě (Ma & Poon 2011).

Při poškození DNA je Plk3 aktivována a fyzicky interaguje s Chk2 (Xie *et al.* 2002), kdy jej fosforyluje na Ser62 a Ser73, mezi kterými se nachází aktivační Thr68 (Bahassi *et al.* 2006). Záměna Ser73 za alanin ovlivnila fosforylaci Thr68, kdy v odpovědi na ionizační záření kináza ATM S73A Chk2 nefosforylovala. S73A Chk2 nemá schopnost fosforylovat Cdc25C na Ser216, čímž je ovlivněn kontrolní bod G2/M. Bahassi *et al.* (2006) navrhují, že fosforylace Ser62 a Ser73 způsobí v molekule Chk2 konformační změnu, která umožňuje kináze ATM účinně fosforylovat aktivační Thr68.

Dřívější nejasnosti ve funkční závislosti PLK3 a Chk2, byly způsobeny vzájemným sdílením jejich substrátů a reciproční aktivací proteinů. Společnými substráty těchto kináz jsou Cdc25C

a p53, které jsou jimi fosforylovány na stejných aminokyselinových zbytcích, čímž zajišťují aktivaci obdobných procesů.



Obr. 13. Schéma znázorňující funkční propojení proteinů, jejichž aktivita je regulována aktivací dráhy ATM/ATR–Chk1/Chk2 v odpovědi na poškození DNA. Jakožto některé proteiny mezi sebou sdílejí substráty, lze předpokládat jejich částečnou vzájemnou zastupitelnost. Celistvost sítě poskytuje více možností regulace odpovědi. (převzato z Ma & Poon, 2011)

5 Význam vrozených alterací *CHEK2* v patogenezi lidských nádorových onemocnění

Objevení významu kináz Chk1 a Chk2 a jejich blízký vztah k tumor supresorovému proteinu p53 (viz Kap. 4.1), vedl na přelomu tisíciletí Bellovou *et al.* (1999) k výzkumu v otázce, zda-li alterace genů *CHEK1* nebo *CHEK2* nemohou být podkladem vzácného, ale klinicky významného vrozeného nádorového onemocnění - Li-Fraumeni syndromu (LFS; OMIM #151623) - jehož genetickou podstatou je přítomnost mutací v genu *p53*.

Vysoké riziko vzniku nádorového onemocnění u nosičů mutace v genu *p53* souvisí se somatickou ztrátou druhé alely v průběhu života. Jako klasická forma je LFS označován v případě, že je mutován gen *TP53*. U této formy se kromě indikativních nádorů jako jsou tumory mozku, sarkomy nebo nádory kůry nadledviny velmi často vyskytuje i karcinom prsu. Existují však případy, kdy nejsou splněna veškerá kritéria klasického LFS nebo gen *TP53* je neporušen (tzv. LFS-like syndrom).

Bellová *et al.* (1999) nenalezli v genu *CHEK1* u *p53*-negativních rodin s klasickými fenotypovými projevy žádnou mutaci, ale v genu *CHEK2* naopak objevili mutaci v zárodečné linii c.470T>C způsobující záměnu aminokyselinového zbytku isoleucinu v pozici 157 za threonin (p.I157T). Po rozšíření souboru nadto identifikovali i prokazatelně patogenní variantu c.1100delC způsobující posun čtecího rámce s předčasnou terminací translace

(p.T367Mfs*15). Tato varianta v postižené rodině segregovala s přítomností nádorového onemocnění (karcinomu prsu, bilaterálního karcinomu prsu a histiocytomu).

Zatímco vliv alterace c.1100delC, vedoucí k syntéze zkráceného proteinového produktu, byl od počátku jasně patrný, dlouhodobé spory probíhaly o význam mutace I157T. Tato mutace postihuje C-koncovou část FHA domény, kde threonin 157 je součástí struktury interagující s kinázovou doménou při aktivační dimerizaci Chk2 (Obr. 5). Wu *et al.* (2001) ve své práci uvedli, že Chk2 s mutací I157T vykazuje kinázovou aktivitu srovnatelnou s wild-type proteinem. Vyslovili domněnku, že však mohou být narušeny interakce s ostatními proteiny, s ohledem na to, že se mutace I157T nachází v FHA doméně, jež tyto asociace zajišťuje. Cai *et al.* (2009) uvedli, že nekonzervativní záměnou jsou narušeny jinak přítomné interakce, které udržuje isoleucin s dalšími hydrofobními aminokyselinami kinázové domény druhého protomeru a ovlivňují dimerizaci proteinu. Wild-type varianta Chk2 je schopna vázat i nefosforylované peptidy, zatímco mutanty I157T Chk2 nikoli, což má vliv na interakce s cílovými substráty (Li *et al.* 2002). V molekule Chk2 s mutací I157T dochází k fosforylaci Thr68 kinázou ATM (Wu *et al.* 2001), ta však není dostatečná, a nevyústí ve fosforylaci Thr383 a Thr387 v aktivační smyčce (Schwarz *et al.* 2003).

Za významnou práci s ohledem na genetiku *CHEK2*, lze rovněž považovat rozsáhlou analýzu Cybulského *et al.* (2004) která ukázala, že mutace v genu *CHEK2* predisponují ke vzniku celé řady nádorových onemocnění (Tab. 1).

Tab. 1. Analýza dvou mutací vedoucích k posunu čtecího rámce (c.1100delC a IVS2+1G>A) a mutace I157T v populacích pacientů s různými nádorovými onemocněními. Nádorová onemocnění pozitivně korelující s výskytem některé ze sledovaných alterací je vyznačena červeně. (Převzato a upraveno z Cybulski *et al.* 2004).

SUBJECT GROUP AND TYPE OF CANCER	NO. OF SUBJECTS TESTED	NO. OF SUBJECTS WITH MUTATION (FREQUENCY IN %)				ODDS RATIO				P			
		IVS2+1G→A	1100delC	Any Truncating Mutation	I157T	IVS2+1G→A	1100delC	Any Truncating Mutation	I157T	IVS2+1G→A	1100delC	Any Truncating Mutation	I157T
Cases:													
Bladder	172	1 (.6)	0	1 (.6)	12 (7.0)	1.2	0	.8	1.5	.7	0	.8	.3
Breast	1,017	11 (1.1)	5 (.5)	16 (1.6)	68 (6.7)	2.3	2.0	2.2	1.4	.04	.3	.02	.02
Colon	300	1 (.3)	2 (.7)	3 (1)	28 (9.3)	.7	2.7	1.4	2.0	.9	.4	.8	.001
Kidney	264	0	2 (.8)	2 (.8)	26 (9.8)	0	2.7	1.0	2.1	0	.5	.8	.0006
Larynx	245	0	0	0	10 (4.1)	0	0	0	.8	0	0	0	.7
Lung	272	0	0	0	7 (2.6)	0	0	0	.5	0	0	0	.1
Melanoma	129	2 (1.5)	1 (.8)	3 (2.3)	6 (4.6)	3.3	3.1	3.2	1.0	.3	.8	.1	.9
Non-Hodgkin lymphoma	120	1 (.8)	0	1 (.8)	11 (9.2)	1.8	0	1.1	2.0	.9	0	.7	.05
Ovary	292	0	0	0	14 (4.8)	0	0	0	1.0	0	0	0	.9
Pancreas	93	0	0	0	6 (6.4)	0	0	0	1.4	0	0	0	.6
Prostate	690	8 (1.2)	3 (.4)	11 (1.6)	54 (7.8)	2.5	1.7	2.2	1.7	.05	.2	.04	.002
Stomach	241	4 (1.7)	0	4 (2.1)	13 (5.4)	3.5	0	2.3	1.1	.05	0	.2	.8
Thyroid	173	5 (2.9)	1 (.6)	6 (3.5)	15 (8.7)	6.2	2.3	4.9	1.9	.0003	.9	.0006	.04
Controls	4,000	19 (.48)	10 (.25)	29 (.73)	193 (4.8)

Vztah alterací *CHEK2*, především mutace c.1100delC, k predispozici karcinomu prsu a kolorektálního karcinomu byl následně potvrzen řadou dalších prací. Jejich metaanalýzy

prokázaly, že mutace 1100delC je klinicky významným genetickým faktorem ovlivňujícím riziko vzniku karcinomu prsu (Weischer *et al.* 2008) a kolorektálního karcinomu (Xiang *et al.* 2011). Na základě těchto analýz mohlo být provedeno zhodnocení celoživotního rizika vzniku nádorových onemocnění u nosičů predispozičních mutací dokládající, že gen *CHEK2* patří do skupiny onemocnění se střední penetrancí (celoživotní riziko vzniku onemocnění je mezi 20 – 50%). S ohledem na dostupná klinická data byla rovněž vypracována doporučení pro časnou diagnostiku a prevenci nádorového onemocnění u nosičů mutací.

Podobně jako je tomu i u vrozených alterací dalších predispozičních genů, výskyt patogenních mutací v jednotlivých regionech světa se významně liší (Tab. 2). Nejvyšší výskyt c.1100delC byl doposud zaznamenán v severní Evropě; jižním směrem dochází k významnému poklesu frekvence této alterace. V nebělošských populacích je výskyt mutací v genu *CHEK2* velmi sporadický, a tudíž i klinicky je v těchto populacích vyšetření genu *CHEK2* málo významné.

Tab. 2: Frekvence výskytu nejčastěji studované hereditární mutace c.1100delC u pacientek s karcinomem prsu (Upraveno podle Kleibl *et al.* 2005)

Stát	Pacienti s ca prsu		Kontroly	
	Počet vyšetřených	1100delC (%)	Počet vyšetřených	1100delC (%)
Nizozemí	2851	102 (3,58)	909	9 (0,99)
Finsko	1489	34 (2,28)	2332	31 (1,33)
Německo	516	8 (1,55)	1315	6 (0,46)
Velká Británie	3450	42 (1,21)	4037	21 (0,52)
USA	300	3 (1,00)	1665	5 (0,30)
Austrálie	1474	10 (0,68)	736	1 (0,14)
Israel	219	1 (0,46)	146	0
Polsko	1017	5 (0,49)	4000	10 (0,25)
ČR	1046	4 (0,38)	730	2 (0,27)
Itálie	939	1 (0,11)	334	0
Španělsko	456	0	400	0

Populační frekvence mutace 1100delC v ČR je nižší než 0,3%; zvýšený výskyt však byl zaznamenán v populacích pacientů s karcinomem prsu a některých dalších nádorů (Kleibl *et al.* 2005). V populacích nádorových pacientů v ČR se rovněž vyskytují četné, a pravděpodobně populačně specifické, missense varianty postihující oblast FHA domény. Specifickou genetickou alterací, která doposud byla popsána pouze v populaci pocházející z ČR je rozsáhlá delece postihující exony 8 a 9 (c.909-2028_1095+330del5395), která způsobuje vznik aberantní mRNA (Walsh *et al.* 2006). Jejím přepisem dochází k posunu čtecího rámce a vzniku zkráceného proteinového produktu postrádajícího podstatnou část kinázové domény (p.M304Lfs*16).

Zajímavé zjištění přinesla práce Brennana *et al.* (2007) ukazující, že výskyt missense varianty genu *CHEK2* (I157T) negativně koreluje s výskytem karcinomu plic a horních cest dýchacích a to především u kuřáků. Třebaže mechanismus této asociace není zcela zřejmý, autoři spekulují, že přítomnost Chk2 poškozeného mutací I157T v progenitorových buňkách atakovaných účinky karcinogenních látek tabákového kouře vyvolává nižší kumulaci genotoxických poškození.

6 Závěr

Kináza Chk2, kódovaná genem *CHEK2*, sehrává důležitou roli v odpovědi buňky na přítomnost poškození genomové DNA, především v případě dvouřetězcových zlomů. Vlivem aktivace proteinu ATM je Chk2 kináza aktivována a fosforyluje řadu cílových proteinů negativně regulujících průběh buněčného cyklu v jeho kontrolních bodech. Primárním cílem kinázové aktivity Chk2 je tumor supresorový protein p53. Zástava buněčného cyklu umožňuje reparaci genomové DNA a v případě jejího neúspěchu indukcii apoptózy. Kináza Chk2 se podílí i na regulaci těchto dějů.

Vrozené mutace v genu *CHEK2* predisponují ke vzniku celé řady nádorových onemocnění. Mezi nejdůležitější patří karcinom prsu, který je nejčastějším zhoubným nádorovým onemocněním v populaci žen v ČR.

Třebaže aktivita kinázy Chk2 byla popsána před více než 15 lety a její klinický význam dokumentuje více než 150 studií v databázi PubMed, studium alterací genu *CHEK2* není zdaleka u konce. Mezi základní otázky, které nejsou vyřešeny, patří stanovení významu řady zatím nejasných missense variant genu a jejich vztahu k jednotlivým nádorovým onemocněním. Tento požadavek je obzvláště naléhavý v souvislosti s uvažovanou protinádorovou léčbou cílenou na modulaci enzymové aktivity Chk2 pomocí jejich specifických inhibitorů (Matijssen *et al.* 2012)

7 Seznam použité literatury

- Ahn, J., Schwarz, J., Piwnica-Worms, H., & Canman, C. (2000). Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer research*, 5934–5936.
- Ahn, J.-Y., Li, X., Davis, H. L., & Canman, C. E. (2002). Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 protein kinase via the forkhead-associated domain. *The Journal of biological chemistry*, 277(22), 19389–95.
- Amaral, J. D., Castro, R. E., Steer, C. J., & Rodrigues, C. M. P. (2009). P53 and the Regulation of Hepatocyte Apoptosis: Implications for Disease Pathogenesis. *Trends in molecular medicine*, 15(11), 531–41.
- Bahassi, E M, Ovesen, J. L., Riesenberga, L., Bernstein, W. Z., Hasty, P. E., & Stambrook, P. J. (2008). The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene*, 27(28), 3977–3985.
- Bahassi, El Mustapha, Myer, D. L., McKenney, R. J., Hennigan, R. F., & Stambrook, P. J. (2006). Priming phosphorylation of Chk2 by polo-like kinase 3 (Plk3) mediates its full activation by ATM and a downstream checkpoint in response to DNA damage. *Mutation research*, 596(1-2), 166–76.
- Bartkova, J., Horejsí, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldborg, P., *et al.* (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 434(7035), 864–70.
- Bell, D. W. (1999). Heterozygous Germ Line hCHK2 Mutations in Li-Fraumeni Syndrome. *Science*, 286(5449), 2528–2531.
- Biswas, A. K., & Johnson, D. G. (2012). Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage. *Cancer research*, 72(1), 13–7.
- Blasina, A., De Weyer, I. V., Laus, M. C., Luyten, W. H., Parker, A. E., & McGowan, C. H. (1999). A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase. *Current biology*, 9(1), 1–10.
- Brennan, P., McKay, J., Moore, L., Zaridze, D., Mukeria, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., *et al.* (2007). Uncommon CHEK2 mis-sense variant and reduced risk of tobacco-related cancers: case control study. *Human molecular genetics*, 16(15), 1794–801.
- Brown, a L., Lee, C. H., Schwarz, J. K., Mitiku, N., Piwnica-Worms, H., & Chung, J. H. (1999). A human Cds1-related kinase that functions downstream of ATM protein in the cellular response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 3745–50.

- Cai, Z., Chehab, N. H., & Pavletich, N. P. (2009). Structure and activation mechanism of the CHK2 DNA damage checkpoint kinase. *Molecular cell*, 35(6), 818–29.
- Cybulski, C., Górski, B., Huzarski, T., Masojć, B., Mierzejewski, M., Debniak, T., Teodorczyk, U., *et al.* (2004). CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *American journal of human genetics*, 75(6), 1131–5.
- Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R. G., Bartek, J., & Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, 410(6830), 842–7.
- Fiscella, M., Zhang, H., Fan, S., Sakaguchi, K., Shen, S., Mercer, W. E., Vande Woude, G. F., *et al.* (1997). Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), 6048–53.
- Fujimoto, H., Onishi, N., Kato, N., Takekawa, M., Xu, X. Z., Kosugi, a, Kondo, T., *et al.* (2006). Regulation of the antioncogenic Chk2 kinase by the oncogenic Wip1 phosphatase. *Cell death and differentiation*, 13(7), 1170–80.
- Hirao, A., Kong, Y. Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., *et al.* (2000). DNA Damage-Induced Activation of p53 by the Checkpoint Kinase Chk2. *Science*, 287(5459), 1824–1827.
- Hoffmann, I., Clarke, P. R., Marcote, M. J., Karsenti, E., & Draetta, G. (1993). Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *The EMBO journal*, 12(1), 53–63.
- Hoffmann, I., Draetta, G., & Karsenti, E. (1994). Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *The EMBO journal*, 13(18), 4302–10.
- Hsu, L. C., & White, R. L. (1998). BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Cell Biology*, 95(22), 12983–8.
- Chabalier-Taste, C., Racca, C., Dozier, C., & Larminat, F. (2008). BRCA1 is regulated by Chk2 in response to spindle damage. *Biochimica et biophysica acta*, 1783(12), 2223–33.
- Chaturvedi, P., Eng, W. K., Zhu, Y., Mattern, M. R., Mishra, R., Hurle, M. R., Zhang, X., *et al.* (1999). Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene*, 18(28), 4047–54.
- Chehab, N. H., Malikzay, A., Stavridi, E. S., & Halazonetis, T. D. (1999). Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13777–82.
- Chehab, N., Malikzay, A., Appel, M. & Halazonetis, T.D. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G1 by stabilizing p53. *Genes & Development*, 278–288.

- Jinno, S., Suto, K., Nagata, A., Igarashi, M., Kanaoka, Y., Nojima, H. & Okayama H. (1994). Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *The EMBO Journal*, 13(7), 1549–1556.
- Karlsson, C., Katich, S., Hagting, A., Hoffmann, I. & Pines, J. (1999). Cdc25B and Cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis. *The Journal of cell biology*, 146(3), 573–583.
- Karlsson-Rosenthal, C., & Millar, J. B. (2006). Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends in cell biology*, 16(6), 285–92.
- Kim, S. T., Lim, D. S., Canman, C. E., & Kastan, M. B. (1999). Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *The Journal of biological chemistry*, 274(53), 37538–43.
- Kleibl, Z., Novotny, J., Bezdickova, D., Malik, R., Kleiblova, P., Foretova, L., Petruzelka, L., *et al.* (2005). The CHEK2 c.1100delC germline mutation rarely contributes to breast cancer development in the Czech Republic. *Breast cancer research and treatment*, 90(2), 165–7.
- Lee, C. H., & Chung, J. H. (2001). The hCds1 (Chk2)-FHA domain is essential for a chain of phosphorylation events on hCds1 that is induced by ionizing radiation. *The Journal of biological chemistry*, 276(32), 30537–41.
- Lee, J., Collins, K., Brown, A., Lee, C., & Chung, J. (2000). hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature*, 404(6774), 201–4.
- Leroy, C., Lee, S., Vaze, M., & Ochsenbien, F. (2003). PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Molecular cell*, 11, 827–835.
- Li, J., Williams, B. L., Haire, L. F., Goldberg, M., Wilker, E., Durocher, D., Yaffe, M. B., *et al.* (2002). Structural and functional versatility of the FHA domain in DNA-damage signaling by the tumor suppressor kinase Chk2. *Molecular cell*, 9(5), 1045–54.
- Lilley, C. E., & Weitzman, M. D. (2010). Keeping viruses in Chk: DNA damage signaling puts the brakes on transformation. *Cell host & microbe*, 8(6), 464–6.
- Lindqvist, A., De Bruijn, M., Macurek, L., Brás, A., Mensinga, A., Bruinsma, W., Voets, O., *et al.* (2009). Wip1 confers G2 checkpoint recovery competence by counteracting p53-dependent transcriptional repression. *The EMBO journal*, 28(20), 3196–206.
- Lomonosov, M., Anand, S., Sangrithi, M., Davies, R., & Venkitaraman, A. R. (2003). Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes & development*, 17(24), 3017–22.
- Ma, H. T., & Poon, R. Y. C. (2011). How protein kinases co-ordinate mitosis in animal cells. *The Biochemical journal*, 435(1), 17–31.

- Macurek, L., Benada, J., Müllers, E., Halim, V. a, Krejčíková, K., Burdová, K., Pecháčková, S., *et al.* (2013). Downregulation of Wip1 phosphatase modulates the cellular threshold of DNA damage signaling in mitosis. *Cell cycle*, 12(2), 251–62.
- Mailand, N. (2000). Rapid Destruction of Human Cdc25A in Response to DNA Damage. *Science*, 288(5470), 1425–1429.
- Matijssen, C., Silva-Santisteban, M. C., Westwood, I. M., Siddique, S., Choi, V., Sheldrake, P., Van Montfort, R. L. M., *et al.* (2012). Benzimidazole inhibitors of the protein kinase CHK2: clarification of the binding mode by flexible side chain docking and protein-ligand crystallography. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(22), 6630–9.
- Matsuoka, S., Huang, M. & Elledge, S. J. (1998). Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase. *Science*, 282(5395), 1893–1897.
- Molinari, M., Mercurio, C., Dominguez, J., Goubin, F., & Draetta, G. F. (2000). Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Reports*, 1(1), 71–79.
- O’Neill, T., Dwyer, a J., Ziv, Y., Chan, D. W., Lees-Miller, S. P., Abraham, R. H., Lai, J. H., *et al.* (2000). Utilization of oriented peptide libraries to identify substrate motifs selected by ATM. *The Journal of biological chemistry*, 275(30), 22719–27.
- Oliva-Trastoy, M., Berthonaud, V., Chevalier, a, Ducrot, C., Marsolier-Kergoat, M.-C., Mann, C., & Leteurtre, F. (2007). The Wip1 phosphatase (PPM1D) antagonizes activation of the Chk2 tumour suppressor kinase. *Oncogene*, 26(10), 1449–58.
- Oliver, A. W., Knapp, S., & Pearl, L. H. (2007). Activation segment exchange: a common mechanism of kinase autophosphorylation? *Trends in biochemical sciences*, 32(8), 351–6.
- Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S. & Piwnica-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 Checkpoint Control: Regulation of 14-3-3 Protein Binding by Phosphorylation of Cdc25C on Serine-216. *Science*, 277(5331), 1501–1505.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H. & Elledge, S. J. (1997). Conservation of the Chk1 Checkpoint Pathway in Mammals: Linkage of DNA Damage to Cdk Regulation Through Cdc25. *Science*, 277(5331), 1497–1501.
- Sanchez, Y., Desany, B. a, Jones, W. J., Liu, Q., Wang, B., & Elledge, S. J. (1996). Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science*, 271(5247), 357–60.
- Sankaran, S., Starita, L., & Groen, A. (2005). Centrosomal microtubule nucleation activity is inhibited by BRCA1-dependent ubiquitination. *Molecular and Cellular Biology*, 25(19), 8656–68.
- Sevcik, J., Falk, M., Kleiblova, P., Lhota, F., Stefancikova, L., Janatova, M., Weiterova, L., *et al.* (2012). The BRCA1 alternative splicing variant Δ 14-15 with an in-frame deletion of

- part of the regulatory serine-containing domain (SCD) impairs the DNA repair capacity in MCF-7 cells. *Cellular signalling*, 24(5), 1023–30.
- Shreeram, S., Demidov, O. N., Hee, W. K., Yamaguchi, H., Onishi, N., Kek, C., Timofeev, O. N., *et al.* (2006). Wip1 phosphatase modulates ATM-dependent signaling pathways. *Molecular cell*, 23(5), 757–64.
- Shrivastav, M., De Haro, L. P., & Nickoloff, J. a. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell research*, 18(1), 134–47.
- Schwarz, J. K., Lovly, C. M., & Piwnica-Worms, H. (2003). Regulation of the Chk2 protein kinase by oligomerization-mediated cis- and trans-phosphorylation. *Molecular cancer research*, 1(8), 598–609.
- Staalesen, V., Falck, J., Geisler, S., Bartkova, J., Børresen-Dale, A.-L., Lukas, J., Lillehaug, J. R., *et al.* (2004). Alternative splicing and mutation status of CHEK2 in stage III breast cancer. *Oncogene*, 23(52), 8535–44.
- Stevens, C., & La Thangue, N. B. (2004). The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA repair*, 3(8-9), 1071–9.
- Stevens, C., Smith, L., & La Thangue, N. B. (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nature cell biology*, 5(5), 401–9.
- Takai, H., Naka, K., Okada, Y., Watanabe, M., Harada, N., Saito, S., Anderson, C. W., *et al.* (2002). Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *The EMBO journal*, 21(19), 5195–205.
- Walsh, T., Casadei, S., Coats, K. H., Swisher, E., Stray, S. M., Higgins, J., Roach, K. C. *et al.* (2006). Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA*, 295(12).
- Ward, I. M., Wu, X., & Chen, J. (2001). Threonine 68 of Chk2 is phosphorylated at sites of DNA strand breaks. *The Journal of biological chemistry*, 276(51), 47755–8.
- Weischer, M., Bojesen, S. E., Ellervik, C., Tybjaerg-Hansen, A., & Nordestgaard, B. G. (2008). CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. *Journal of clinical oncology*, 26(4), 542–8.
- Wu, X., Webster, S. R., & Chen, J. (2001). Characterization of tumor-associated Chk2 mutations. *The Journal of biological chemistry*, 276(4), 2971–4.
- Wu, Xianglin, & Chen, J. (2003). Autophosphorylation of checkpoint kinase 2 at serine 516 is required for radiation-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 278(38), 36163–8.
- Wymann, M. P., Bulgarelli-Leva, G., Zvelebil, M. J., Pirola, L., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D., & Panayotou, G. (1996). Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-

- kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Molecular and cellular biology*, 16(4), 1722–33.
- Xiang, H., Geng, X., Ge, W., & Li, H. (2011). Meta-analysis of CHEK2 1100delC variant and colorectal cancer susceptibility. *European journal of cancer*, 47(17), 2546–51.
- Xie, S., Wu, H., Wang, Q., Kunicki, J., Thomas, R. O., Hollingsworth, R. E., Cogswell, J., *et al.* (2002). Genotoxic stress-induced activation of Plk3 is partly mediated by Chk2. *Cell cycle*, 1(6), 424–9.
- Xu, X., Tsvetkov, L., & Stern, D. (2002). Chk2 activation and phosphorylation-dependent oligomerization. *Molecular and cellular biology*, 22(12), 4419–4432.
- Yoda, A., Xu, X. Z., Onishi, N., Toyoshima, K., Fujimoto, H., Kato, N., Oishi, I., *et al.* (2006). Intrinsic kinase activity and SQ/TQ domain of Chk2 kinase as well as N-terminal domain of Wip1 phosphatase are required for regulation of Chk2 by Wip1. *The Journal of biological chemistry*, 281(34), 24847–62.
- Zannini, L., Lecis, D., Lisanti, S., Benetti, R., Buscemi, G., Schneider, C., & Delia, D. (2003). Karyopherin-alpha2 protein interacts with Chk2 and contributes to its nuclear import. *The Journal of biological chemistry*, 278(43), 42346–51.
- Zhang, J., Willers, H., & Feng, Z. (2004). Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Molecular and cellular biology*, 24(2), 708–718.

Přehledné práce jsou vyznačeny [modře](#).