

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ FYZIOLOGIE A GENETIKY AKADEMIE VĚD ČR

bakalářská práce

Účast centrosomu na regulaci buněčného cyklu

vedoucí bakalářské práce: Prof.MVDr.Jan Motlík,DrSc.

Vypracoval: Pavel Matuška

Liběchov, 2006

Abstrakt

Buněčný cyklus a snaha o pochopení jeho regulace se stále více stává významným cílem výzkumu. Úloha centrosomu v životním cyklu buňky, se zdá být důležitější, než se původně předpokládalo. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o signálních drahách regulujících průběh buněčného cyklu, které se podle posledních prací zdají být těsně spjaté s centrosomem. Zabývá se bližším pohledem na strukturu a funkční souvislosti centrosomu a na jeho úlohu v G_1/S i v G_2/M přechodu. Pojednává podrobně o nejdůležitějších regulačních proteinech, zahrnuje jejich funkci do souvislosti s průběhem buněčného cyklu a zdůrazňuje vzájemné vztahy a interakce mezi nimi. Jsou popsány také důsledky, které má poškození DNA na centrosom a s ním spojené regulační dráhy.

Obsah

1. Úvod.....	4
2. Struktura a funkce centrosomu v buňce.....	5
2.1 Stavba centrosomu a jeho části.....	5
2.2 Cyklus centrosomu a jeho duplikace.....	5
2.3 Tvorba dělicího vřeténka, cytokineze.....	7
3. G ₁ /S - přechod buněčného cyklu.....	8
3.1 Centrosom a cyklin E v G ₁ /S.....	8
3.2 Vstup do S – fáze.....	9
3.2.1 Interakce Cdk2 – cyklin E – CDC25A.....	9
3.2.2 Interakce Rb – E2F.....	10
3.2.3 Interakce Cdk4,6 – cyklin D.....	10
3.2.4 Interakce CKI – Cdk4,6/cyklin D – Cdk2/cyklinE.....	11
3.3 PKB aktivita v G ₁ /S.....	11
4. G ₂ /M – přechod buněčného cyklu.....	12
4.1 Zahájení mitózy.....	12
4.1.1 Aktivace Cdk1/cyklin B1 komplexu.....	13
4.1.2 Regulace aktivity Cdk1.....	13
4.2 Role CDC25 fosfatáz v G ₂ /M.....	15
4.2.1 Funkce CDC25B na centrosomu.....	15
4.2.2 Kooperace CDC25A a CDC25B.....	15
4.3 Aurora-A.....	17
4.3.1 Fosforylace CDC25B Aurorou-A.....	18
4.3.2 Aktivace Aurory-A.....	18
4.4 Vliv PKB na regulaci mitózy.....	19
5. Centrosom pod vlivem poškození DNA.....	20
6. Závěr.....	22
7. Přehled literatury.....	23

1. Úvod

Poměrně dlouhou dobu je o centrosomu známo, že je nezbytnou součástí buněčného cytoskeletu. Byla posána jeho funkce v organizaci interfázních mikrotubulů, které zajišťují polaritu buňky a také jeho role při tvorbě mitotického dělicího vřeténka separující kondenzované chromosomy. Podle nejnovějších poznatků se ovšem zdá, že zastává také mnohem důležitější funkci, a to v regulaci buněčného cyklu.

Předpokládá se, že centrosom slouží jako podpurná konstrukce (scaffold) k ukotvení četných signálních drah, jako pevný bod umožňující integraci komplexních regulačních sítí. Tyto představy jsou založeny na na rostoucím počtu s centrosomem spojených regulačních proteinů. Kromě toho, je zde lokalizováno velké množství dalších proteinů mnoha různých aktivit (Tab.1). V této souvislosti se účast centrosomu na životních funkcích buňky stává zcela nezbytnou.

Tématem této práce je charakterizovat funkci centrosomu v mechanismech regulujících průběh buněčného cyklu, zejména jeho přechodů a regulačních proteinů.

Table 1. Proteins reported to localize to the centrosome^a

Category	Number of proteins per category
Ubiquitination and protein degradation	23
Nuclear transport/spindle assembly	4
Cytoskeletal regulators	22
CDKs and cyclins	5
Mitotic regulators	8
Chaperonins	3
Apoptosis related	8
DNA damage checkpoint	4
MAPK pathway	8
Spindle checkpoint	6
Mitotic exit/MEN	9
Cytokinesis/SIN	11
Transcription regulators	4
mRNA/mRNA processing	6
G ₁ /S regulation	2
Wnt signaling	3
Membrane receptor signaling	13
Other kinases/phosphatases	7
Golgi regulation	2
Other enzymes	10
Structural/scaffold proteins	60
Microtubule associated proteins (MAPS)	31
Motor proteins	15
Calcium binding	5
Other proteins	30
Viral proteins and infectious agents	13

Tabulka 1:

Seznam proteinů
lokalizovaných na
centrosom.

Převzato z (2).

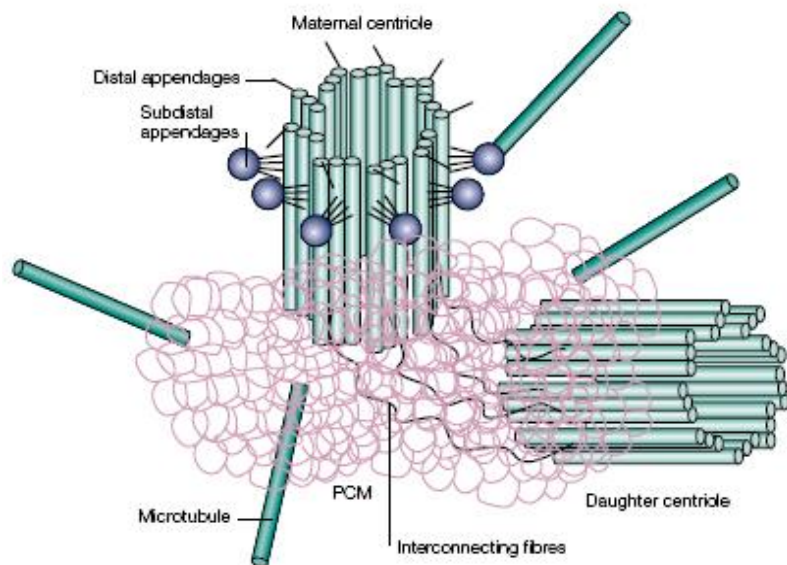
2. Struktura a funkce centrosomu v buňce

Podrobnější pozorování hned na počátku odhalí skutečnost, že centrosom, jako jediná organela v živočišných buňkách, nemá membránu. Byl pojmenován podle toho, že se nachází v blízkosti jádra uprostřed většiny buněk.

2.1 Stavba centrosomu a jeho části

Jádro tvoří dvojice centriol obklopené pericentriolárním materiálem (PCM). Centrioly jsou devítipodjednotkové symetrické struktury připomínající tvarem barely, které k sobě navzájem zaujímají úhel 90° (Obr.1). Jedna z nich, nazývaná mateřská centriola, má na distálním konci zakončení, kterými kotví minus konce astrálních mikrotubulů. Mezi sebou jsou centrioly propojeny drobnými kohezními vlákny. Pericentriolární materiál se jeví jako síťovina navzájem propojených vláken tvořících velmi dynamickou matrix. PCM je odpovědný za nukleaci (tvorbu) mikrotubulů. Právě tato schopnost udílí centrosomu titul organizačního centra mikrotubulů (MTOC). Templátem pro nukleaci mikrotubulů jsou

prstence obsahující γ -tubulin (γ -TuRC). Ten je velmi podobný α - a β -tubulinu, z nichž polymerují mikrotubuly, ale není do nich inkorporován. γ -TuRCs jsou lokalizovány především na centrosomu, ale i v cytoplasmě (3).



Obrázek 1: Struktura centrosomu. Převzato z (3).

2.2 Cyklus centrosomu a jeho duplikace

Spojení chromosomů s centrosomem prostřednictvím mitotického dělicího vřeténka předurčuje tyto spoluhráče k obdobným dynamickým změnám v průběhu buněčného cyklu. Porovnání jejich životních cyklů ukazuje, že mají mnoho společného. Cyklus centrosomální zajišťuje, že každá nově vznikající buňka obdrží právě po jednom

centrosomu se dvěma centriolami. Po cytokinezi se centrioly od sebe oddělí, ale zůstávají spojeny kohezními vlákny po celou G_1 – fázi. Vstup do S- fáze je kritickým bodem, na jehož úrovni dochází k iniciaci duplikace centrosomu, a tím i k regulaci počtu centrosomů v buňce, který rozhoduje o rovnoměrném rozdělení chromosomů v mitóze. Právě proto je mechanismus regulující iniciaci duplikace zajištěn několika faktory.

Prvním z nich je konformace centriol. Jejich vzájemná poloha v S, G_2 a M – fázi je 90° a tento stav se přirovnává k “zasnoubeným centriolám“. Toto uspořádání pravděpodobně blokuje místa po stranách centriol, odkud se obvykle tvoří centriola nová a zabraňuje tak re-duplikaci centriol (4). Naproti tomu již výše zmiňované oddělení centriol po dokončení mitózy je považováno za moment oprávnění k duplikaci.

Druhým faktorem iniciující duplikaci je komplex Cdk2 (cyklin dependentní kináza 2) a cyklinu E, který je na centrosom vázán CG-NAP (centrosome and Golgi-localized PKN-associated protein) (13).

Třetím faktorem je přítomnost multifunkčního proteinu nucleophosminu, který je substrátem Cdk2/cyklin E komplexu. V G_1 – fázi buněčného cyklu se nucleophosmin váže přímo na centrioly a svou přítomností blokuje jejich duplikaci v té fázi cyklu centrosomu, kdy není prostřednictvím konformace centriol bráněno jejich re-duplikaci. Pro zahájení S - fáze a tím i zahájení tvorby nových centriol je tedy nezbytná hlavně správná konformace centriol a také přítomnost Cdk2/cyklin E komplexu, který fosforyluje nucleophosmin. Ten poté disociuje a uvolní místo pro duplikaci centrosomu. Byla publikována práce, která ukazuje, že v embryonálních buňkách injikovaných Cdk inhibítorem (p21) nedochází k duplikaci centrosomu, protože p21 se váže na Cdk2 a blokuje jeho aktivitu (6).

Elongace nově se tvořících centriol probíhá až do pozdní G_2 – fáze. V časně fázi mitózy se ruší kohezní spoj mezi centriolami, jehož částí je i C-Nap1 protein. Proces přerušování koheze není doposud zcela objasněn, předpokládá se však, že C-Nap1 protein je fosforylován Nek2 kinasou a disociuje z centrosomu (8). Oddělené centrosomy poté organizují formaci mitotického dělicího vřeténka. Zbývá ještě podotknout, že byla popsána tvorba centrosomů *de novo* v HeLa buňkách, a to při zničení nebo odstranění centrosomu z buňky (5).

Chromosomy v rámci buněčného cyklu sdílí s centrosomem výjimečnou schopnost duplikace, a to právě jednou v jednom cyklu. Tato duplikace je navíc iniciována ve stejnou dobu (G_1/S – přechod) a také stejnými proteiny (Cdk2/cyklinE,A). Replikace obou je semikonzervativní, tzn. každá nově vzniklá jednotka obsahuje starou i novou

podjednotku. V těchto souvislostech se zdá, že DNA replikace vyžaduje přítomnost centrosomu, který váže regulační proteiny nezbytné pro vstup do S - fáze (probíráno v 3. kapitole).

2.3 Tvorba dělicího vřeténka, cytokineze

To, že centrosom je hlavním prvkem v tvorbě mitotického dělicího vřeténka a zajišťuje důmyslný aparát separující chromosomy, je známo již od jeho objevu. V pozdní G₂ – fázi je duplikace centrosomu dokončena, obě mateřské centrioly kotví astrální mikrotubuly. Přerušением kohezního spoje mezi centrosomy je v profázi mitotického cyklu umožněna separace centrosomů k pólům budoucího mitotického vřeténka. Pohyb separující centrosomy od sebe, je umožněn motorovým proteinem Eg5. Rozpad jaderné membrány v prometáfázi otvírá cestu mikrotubulům vřeténka ke kinetochorám chromosomů, které jsou pak separovány do nově vznikajících dceřiných buněk (pro přehled více v (1)).

Překvapivě odstranění centrosomů nezabrání formaci funkčního dělicího vřeténka (7). Fyzickým oddělením centrosomů interfázních buněk od jader vznikly karyoplasty, které byly schopny vstoupit do mitózy, ale všechny se zastavily před S – fází. Bylo zjištěno, že karyoplasty regenerují MTOC centra, obsahující γ -tubulin i pericentrin, ale v žádném případě neobsahují centrioly. Je tedy zřejmé, že centrosomální struktury acentriolárních MTOC center jsou schopny kompenzovat absenci centriol při zahájení mitózy, ale nenahradí důležitou funkci centriol při vstupu do S – fáze (kap.3.1).

Pro cytokinezi je důležité správné umístění pólů dělicího vřeténka, díky němuž je symetricky rozdělena cytoplazma a determinanty buněčného vývoje. Ukončení mitózy zaškrcením buňky pomocí kontraktilního prstence koreluje s pohybem mateřské centrioly k intracelulárnímu můstku propojující dělicí se buňky. V důsledku toho aktinová vlákna kontraktilního prstence depolymerují a můstek se zužuje. Mateřská centriola se vrací zpět k opačnému pólu a buňky se od sebe oddělí (46). Odstranění centrosomu znemožní dokončení cytokineze ze stejného důvodu jako v případě zastavení před S – fází a buňky zůstanou spojeny cytoplasmatickým můstkem (7).

3. G₁/S - přechod buněčného cyklu

Po mitóze následující G₁ fáze dává buňce čas nejen k růstu, ale také k monitorování prostředí a vyhodnocování metabolických podmínek v tkáni i organismu. V případě nevhodného prostředí buňka vystoupí z cyklu do G₀ fáze. V této fázi také setrvávají nedělící se diferenciované buňky.

Na rozdíl od ostatních fází buněčného cyklu, G₁ je pod vlivem okolního prostředí a mitogeních signálů, které například indukují expresi cyklinů D. Situace se ovšem mění po průchodu buňky restričním místem nacházejícím se těsně před G₁/S přechodem. V té chvíli je rozhodnuto, buňka vstupuje do S – fáze, a po krátké G₂ se dělí. Po průchodu restričním místem probíhá cyklus nezávisle na prostředí.

3.1 Centrosom a cyklin E v G₁/S

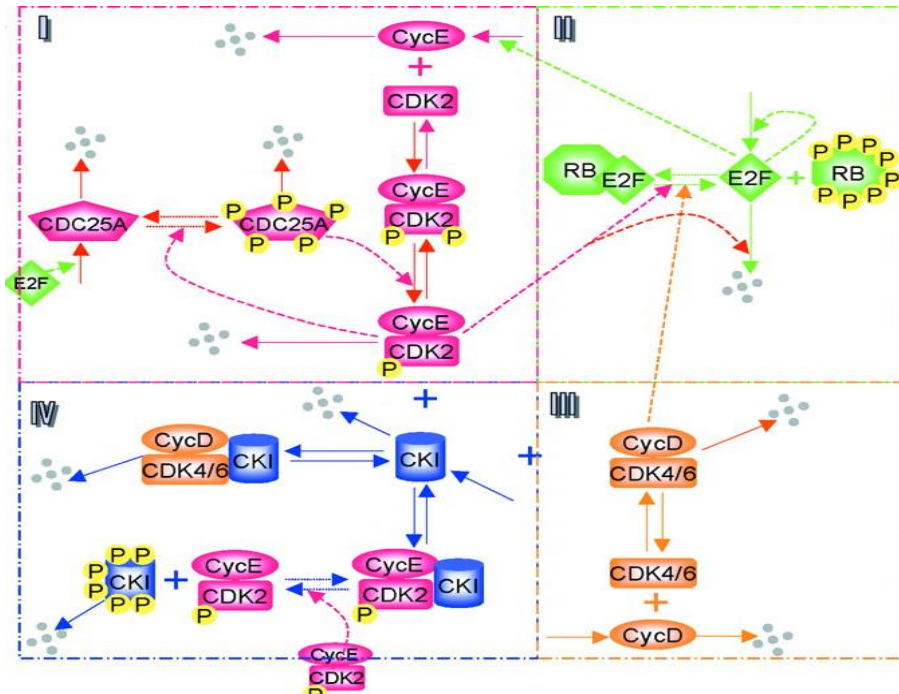
Jak již bylo zmíněno výše, odstranění centrosomů vede ke G₁ arrestu (7). Acentriolární MTOC centra umožní zahájení mitózy, ale cyklus je zastaven před vstupem do S – fáze. Recentní práce (10) ukazuje, že tento G₁ arrest je způsoben nepřítomností centriol, na které je v centrosomu lokalizován cyklin E. Ačkoliv je známo, že Cdk2/cyklin E komplex je vyžadován pro vstup do S – fáze, z výsledků této práce vyplývá, že narozdíl od cyklinu E není přítomnost Cdk2 nezbytná.

K akumulaci cyklinu E dochází ihned po průchodu restričním místem. Pro zjištění vazebné domény na centrosom byla provedena detailní analýza mutant Myc-cyclin E. Jako centrosomální lokalizační signál (CLS) byla v cyklinu E identifikována sekvence nukleotidů v rozmezí 231-250. Mutace cyklinu E ve vazebné doméně pro Cdk2 neovlivnila vstup do S – fáze, ale mutace v CLS se ukázala být kritickou a bránila stimulaci DNA syntézy (10). Vstup do S – fáze vyžadující lokalizaci cyklinu E tedy nezávisí na Cdk2, ale závisí na intaktní CLS. Role Cdk2/cyklin E komplexu je tedy nejen v duplikaci centrosomu, ale i při vstupu do S – fáze.

Právě popsany mechanismus může být příkladem toho, jak centrosom reguluje chromosomální (jaderný) cyklus vazbou substrátů jako cyklin E, nezávisle na regulaci buněčného cyklu Cdk kinázami. Pro přehled více (11, 12).

3.2 Vstup do S – fáze

Byl vypracován model zahrnující klíčové molekuly a jejich interakce, které byly experimentálně identifikovány při účasti na G₁/S přechodu buněčného cyklu (14).



Obrázek 2: Schéma modelu signalizace při vstupu do S – fáze (obrázek modifikován a zjednodušen) Převzato z (14).

Model je rozdělen do čtyř jednotlivých částí podle interagujících molekul (Obr.2).

3.2.1 Interakce Cdk2 – cyklin E – CDC25A

Akumulace cyklinu E na centrosomu po průchodu restrikcčním místem reguluje nárůst aktivity Cdk2/cyklin E komplexu. Ten je navíc ještě posttranslačně modifikován. Hladina exprese cyklinu E je ovlivňována transkripčními faktory E2F a c-Myc. Interakcí Cdk2 a cyklinu E tedy vzniká Cdk2/cyklin E komplex, který je ovšem inaktivní, protože je inhibičně fosforylován na T14 a Y15. Za tuto fosforylaci jsou odpovědné Wee1/Mik1/Myt1 Cdk inhibující kinázy. Defosforylaci na těchto místech naopak provádí CDC25A fosfatáza díky své duální specifitě vůči Cdk kinázám, a stává se tak protihráčem inhibujících kináz. Aktivita Cdk2/cyklin E komplexu je navíc regulována degradací na úrovni cyklinu E i na úrovni aktivního komplexu (šedé tečky v obr.2).

CDC25A fosfatáza je nezbytným aktivátorem buněčného cyklu. Její exprese je iniciována v pozdní G₁ fázi aktivitou E2F a c-Myc transkripčních faktorů, přičemž c-Myc působí konstantní stimulací, ale E2F pouze pokud není vázán retinoblastomovým proteinem (pRb). CDC25A se účastní nejen G₁/S přechodu, ale také hraje podstatnou roli v G₂/M (15,19) (probíráno ve 4. kapitole). Kontinuální *de novo* syntéza CDC25A je

vyvažována ubiquitin dependentní degradací realizovanou E3 – ligásmi SCF a APC/C (32). Podstatnou roli v regulaci CDC25A hraje check-point kináza 1 (CHK1), jejíž aktivita v neovlivněném buněčném cyklu zajišťuje stálý metabolický obrát CDC25A. CHK1, pozitivně regulovaná ATR (ataxia-telangiectasia and RAD3 related) kinázou, je aktivní v S a G₂ – fázích i bez DNA damage a fosforyluje CDC25A na S76, 124, 178, 279 a 293 (16). Tato hyperfosforylace indukuje vazbu SCF ligasy vyžadující fosforylovaný substrát určený k degradaci. Na CDC25A se nachází specifické vazebné motivy pro interakci s ligasami. Pro vazbu SCF je nezbytný DSG motiv obsahující βTrCP1/2 vazebné místo, ve kterém právě CHK1 fosforyluje serinová rezidua (17). Při poškození DNA (např. dvojitěřetězcový zlom) je degradace CDC25A velmi výrazně urychlena vlivem ATM (ataxia-telangiectasia mutated) – CHK2 dráhy senzitivující DNA damage. CHK2 přispívá k fosforylaci CDC25A a buněčný cyklus je pozastaven (16,41).

Aktivace CDC25A fosfatázy byla podrobně popsána Hoffmannem et al (9). Výsledky této práce jasně naznačují nezbytnost této molekuly v G₁/S přechodu, neboť ukazují, že CDC25A přímo asociuje s Cdk2/cyklin E komplexem, který ji fosforyluje a tím aktivuje. Aktivní CDC25A zase defosforyluje Cdk2 a vytváří se pozitivní zpětná vazba jejímž výsledkem je aktivace Cdk2/cyklin E komplexu. Ten svým účinkem rekrutuje replikační faktory na replikační počátky DNA molekuly, kde je zahájena syntéza DNA.

3.2.2 Interakce Rb – E2F

Důsledné zajištění regulace E2F je zásadní, protože je transkripčním faktorem mnoha regulačních proteinů a enzymů jako např. DNA polymerázy, Cdk1 i výše popsané CDC25A a cyklinu E. V G₀ a časně G₁ fázi je E2F vázán na Rb protein (pRb) a jeho aktivita je utlumena. Osvobození E2F od Rb proteinu je iniciováno zvýšením exprese cyklinů D v závislosti na mitogeních signálech a aktivaci Cdk4 a Cdk6 cyklin D dependentních kináz, které Rb protein fosforylují. Uvolněný E2F zahájí expresi cyklinu E. Ten slouží jako aktivační protein komplexu Cdk2/cyklin E, který také fosforyluje pRb, čímž se vytváří další pozitivní zpětná vazba. E2F může být zpětně inhibován defosforylovaným pRb nebo degradován ubiquitinací po fosforylaci Cdk2/cyklin E.

3.2.3. Interakce Cdk4,6 – cyklin D

Buňky setrvávající v G₀ fázi vstupují znovu do cyklu působením mitogenů a následným zvýšením koncentrace cyklinů D. Cdk4 i Cdk6 kináza po aktivaci cyklinem D jako první fosforylují pRb a umožňují uvolnění E2F. Rb protein je nezbytným faktorem v regulaci buněčné proliferace a diferenciace. Nedostatek funkčního pRb má vážné

důsledky pro průběh buněčného cyklu. $Rb^{-/-}$ buňky se dělí mnohem rychleji a mají podstatně kratší G_1 – fázi. Navíc v Rb – defektních buňkách nedochází k tvorbě Cdk4/cyklin D1 komplexů i přesto, že je přítomno dostatečné množství obou podjednotek. Při absenci funkčního pRb se tedy zdá být cyklin D1 postradatelný pro regulaci G_1 (18).

3.2.4. Interakce CKI – Cdk4,6/cyklin D – Cdk2/cyklinE

CKI je rodina inhibitorů Cdk kináz, kam patří např. p15, p18, p21 nebo p27. Jejich aktivita je nejvyšší v G_0 fázi, kdy buňky nevstupují do buněčného cyklu a diferenciované buňky tak mohou plnit svoji roli v organismu. Stejně tak je důležitá suprese Cdk kináz při poškození DNA, kdy je aktivován p53 protein, který stimuluje transkripci mRNA p21 inhibitoru. Jeho účinkem je potlačena aktivita Cdk kináz v G_1 – fázi (48). Naopak v cyklující buňce musí být CKI degradovány. V případě p27 je tato degradace paradoxně zprostředkována samotným Cdk2/cyklin E komplexem, který je normálně substrátem p27 inhibitoru. Aktivní Cdk2/cyklin E je schopný fosforylovat p27 na T187, a tím způsobit jeho eliminaci, čímž je umožněn přechod z G_1 do S – fáze (47).

3.3 PKB aktivita v G_1/S

Protein kináza B (PKB, Akt) má široké spektrum účinku zahrnující regulaci metabolismu glukosy, apoptózy, neurodegeneraci a mnoho dalších procesů (20). Buněčný cyklus ovlivňuje svým působením na CKI (např. p21, p27) nebo na regulaci cyklinů D. Také je odpovědná za antiapoptotický efekt. Její aktivita usnadňuje jak G_1/S přechod, tak iniciaci mitózy.

Na regulaci vstupu do S – fáze se PKB/Akt podílí represí účinku CKI proteinů. p27 je z části lokalizován v jádře. PKB/Akt zprostředkovanou fosforylací p27 na T157 (oblast NLS) dochází k translokaci p27 do cytoplasmy. Tím je znemožněna inhibice Cdk2/cyklin E komplexu a nedojde k G_1 arresu (21). V případě p21 je rozdíl pouze v tom, že fosforylace probíhá na T145. Histologické analýzy ukazují korelující množství cytosolického p27 a aktivní PKB/Akt.

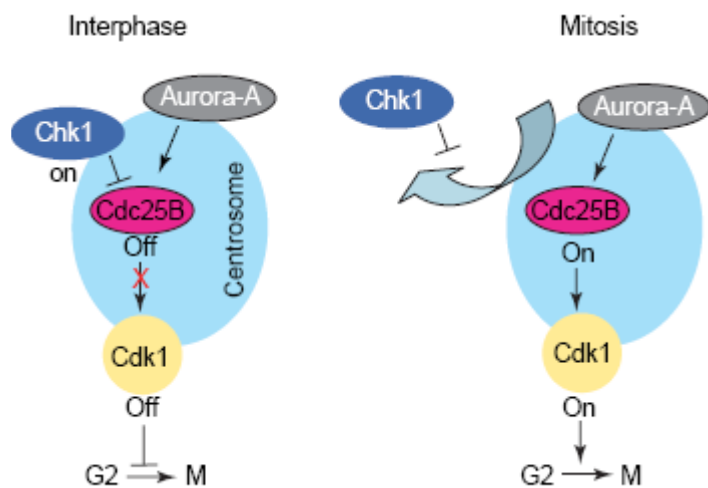
Expresce cyklinu D je závislá na mitogeních signálech, bez kterých je indukována jeho degradace. Glykogen syntáza kináza 3β (GSK- 3β) zprostředkuje fosforylací cyklinu D na T286, což způsobí jeho cytoplasmatickou lokalizaci a proteasom dependentní degradaci. PKB/Akt ovšem inhibuje GSK- 3β a tím zvyšuje akumulaci cyklinu D v jádře (22). Ras – PI-3K – PKB/Akt signální dráha tedy reguluje aktivitu GSK- 3β . Stejně jako u cyklinu D je GSK-3 odpovědná také za degradaci cyklinu E v časně S – fázi.

Dalším substrátem PKB/Akt jsou transkripční faktory FOXO indukující expresi p27 a p21 proteinů. FOXO jsou fosforylovány PKB/Akt, v důsledku toho translokovány do cytoplasmy a degradovány. Tím je zabráněno jejich interakci s promotory p27 a p21 (49).

4. G₂/M – přechod buněčného cyklu

Před koncem S – fáze a v G₂ – fázi buňka obsahuje čtyři centrioly tvořící dva neoddělené centrosomy. Maturace centrosomů probíhá až do pozdní G₂ – fáze. Zároveň již lze zaznamenat předběžné přípravy signalizující blížící se dělení buňky, které zahrnují akumulaci regulačních proteinů, prozatím v neaktivním stavu.

V úvodu zmíněná hypotéza o nezbytnosti centrosomu pro buněčný cyklus a dělení buňky může být podpořena faktem, že v oocytech *Xenopus leavis* zbavených zárodečného vajíčku, do kterých byly injikovány izolované centrosomy, může dojít k aktivaci MPF (23). Ještě bližší souvislost mezi centrosomem a iniciací mitózy vyplývá z práce Kramera et al (26), která popisuje klíčovou regulaci Cdk1 molekuly a lokalizaci jejích modulátorů na centrosom (kap. 4.1.2)



(Obr.3)

Obrázek 3: Centrosom v G₂/M přechodu. Převzato z (2).

4.1 Zahájení mitózy

Cdk1/cyklin B komplex je považován za “master regulator” mitózy, který se akumuluje během G₂ – fáze v cytoplasmě a na centrosomu. Jakmile je aktivován, spouští mitotický cyklus. Prvním signálem zahájení mitózy je separace centrosomů iniciovaná Cdk1 fosforylací Eg5 motorového proteinu. Následuje kondenzace chromatinu v jádře a rozpad jaderné membrány.

4.1.1 Aktivace Cdk1/cyklin B1 komplexu

Zásadní krok pro zahájení mitózy je tedy aktivace Cdk1/cyklin B1 komplexu, také nazývaného mitosis-promoting factor (MPF). Bylo prokázáno, že k této aktivaci dochází právě na centrosomu v profázi mitotického cyklu (24). K určení lokalizace byly použity protilátky proti fosfo-S126 a fosfo-S133 cyklinu B. Obě formy byly detegovány v profázi hlavně na centrosomech, zatímco jaderný signál byl ještě velmi slabý. Ke konci profáze, byl ale detegován hlavně signál jaderný. Z toho vyplývá, že cyklin B1 je nejprve fosforylován - a tím aktivován - v cytoplasmě, přednostně na centrosomu, kde asociuje s Cdk1. Komplex Cdk1/cyklin B1 je poté rychle importován do jádra (24,27), kde fosforylací destabilizuje laminy a indukuje rozpad jaderné membrány. Také podporuje kondenzaci chromatinu. Jaderný import vyžaduje fosforylaci cyklinu B1 na S126, 128, 133 a 147. Tyto serinová rezidua se nachází v CRS (cytoplasmic retention sequence).

Zdá se, že fosforylovaný cyklin B1 také usnadňuje interakci Cdk1 s CDC25 fosfatázami, neboť k aktivaci Cdk1/cyklin B komplexu nestačí pouze asociace Cdk1 a cyklinu B1, ale je nutná defosforylace Cdk1 molekuly na T14 a Y15 (kap.4.2.1). Není doposud jasné, co fosforyluje cyklin B1 a zajišťuje tak jeho import do jádra. Objevila se práce ukazující, že u *Xenopa* je cyklin B fosforylován Plk1 kinázou na S147 (25). V savčích buňkách aktivita Plk1 koreluje s aktivitou MPF. V prasečích oocytech je prokázána kolokalizace Plk1 a MPF, přičemž k aktivaci Plk1 dochází dříve než u MPF (50).

4.1.2 Regulace aktivity Cdk1

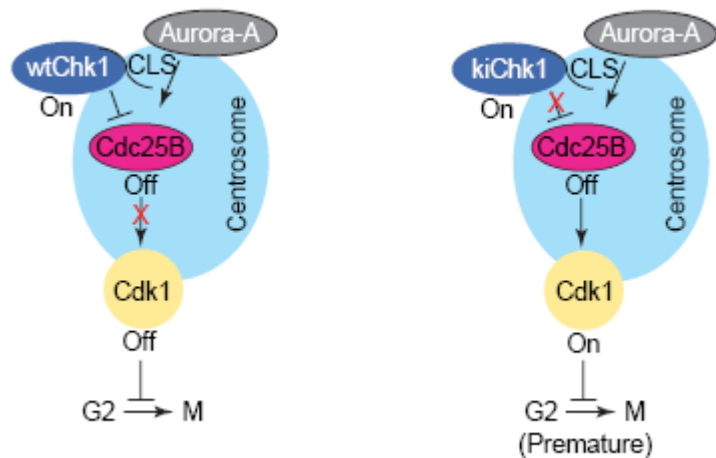
Recentní práce (26), zabývající se úlohou checkpoint proteinů v regulaci dějů asociovaných s centrosomem, ukazuje, že centrosomální Cdk1 je negativně regulována checkpoint kinázou 1 (CHK1).

CHK1 je serin/threonin kináza hrající důležitou roli v intra – S i v G₂/M – kontrolním bodě. Je aktivovaná ATM/ATR signální dráhou při odpovědi na poškození DNA nebo zastavení replikace DNA (kap.5), nicméně je aktivní i v neovlivněných buňkách. Je exprimovaná převážně v S a G₂ – fázi. Původně se předpokládala pouze její jaderná lokalizace, ale byla popsána i její funkce v cytoplasmě.

Imunofluorescenční analýza ukázala kolokalizaci monoklonální protilátky proti CHK1 s C-Nap1 proteinem a γ -tubulinem, což prokázalo její lokalizaci na centrosom. Naproti tomu dělicí vřeténka mitotických buněk nebyla protilátkou proti CHK1 značena vůbec, což svědčí o výhradně interfázni lokalizaci CHK1 na centrosom. Navíc bylo zjištěno vymizení CHK1 signálu z centrosomu právě před zahájením mitózy (26).

Aktivace centrosomální Cdk1 korelující s vymizením CHK1 z centrosomu více než napovídá úzkému vztahu mezi těmito molekulami. K ověření tohoto vztahu byl proveden experiment, ve kterém byly buňky exprimující GFP-CHK1 synchronizovány v S – fázi double-thimidine blokem a uvolněny do G₂ – fáze. Následně byly buňky vystaveny účinku inhibitoru CHK1 (CEP3891). Výsledkem bylo zvýšení počtu buněk, u kterých byla pozorována separace centrosomů, tudíž zahájení mitózy. Navíc byla pomocí koimunofluorescence s fosfo-T15-Cdk1 pozorována předčasná aktivace Cdk1. To znamená, že umělá inhibice CHK1 způsobuje předčasnou separaci centrosomů a vstup do mitózy (26).

Pokud tedy CHK1 v interfázi blokuje aktivaci Cdk1 na centrosomu, měla by hypoteticky i v G₂/M svou přítomností zabránit spuštění mitózy. Proto 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).



Obrázek 4: Centrosom a GFP-CHK1 fúzované s PACT při G₂/M přechodu. Převzato a upraveno z (2).

Díky této doméně byly obě dvě verze GFP-CHK1 cíleně lokalizovány na centrosom i v G₂/M. Zatímco wild-type GFP-CHK1-PACT(wtChk1) si zachovala CHK1 kinázovou aktivitu a inhibovala aktivaci Cdk1, kinase-inactive GFP-CHK1-PACT(kiChk1) nebyla schopná Cdk1 inhibice a došlo k předčasnému vstupu do mitózy (26)(Obr.4).

Jak již vyplývá z obrázku 3 a 4, CHK1 reguluje aktivitu Cdk1 prostřednictvím CDC25B Cdk1-aktivující fosfatázy. V interfázi je CHK1 lokalizovaná na centrosomu a inhibuje CDC25B, čímž je zabráněno spuštění mitózy. V G₂/M naopak CHK1 disociuje z centrosomu a mitotická kináza Aurora-A aktivačně fosforyluje CDC25B, která může defosforylovat Cdk1 a tím zahájit mitotický cyklus (Obr.3). Zajímavé je, že pokud odstranění centrosomů nebrání průběhu mitózy (kap. 2.3), musí existovat jiný způsob regulace Cdk1 nebo není CHK1 kináza zcela nezbytná k aktivaci Cdk1.

4.2 Role CDC25 fosfatáz v G₂/M

Cdk1 kináza je tedy pod negativním vlivem CHK1. Nicméně je zřejmé, že CHK1 kináza na centrosomu přímo neinteraguje s Cdk1, ale působí na ni prostřednictvím CDC25B fosfatázy. Ta je velmi důležitým prostředníkem mezi CHK1 a Cdk1.

4.2.1 Funkce CDC25B na centrosomu

CDC25B fosfatáza v interfázi lokalizovaná v jádře je během pozdní S – fáze aktivovaná fosforylací v důsledku interakce s Cdk2/cyklin A komplexem. Redukce exprese cyklinu A pomocí RNAi inhibuje aktivaci CDC25B a vstup do mitózy (28). Během G₂ – fáze je CDC25B translokována do cytoplasmy, kde dochází k její akumulaci. Její substrátová specifita je závislá na buněčné fázi, protože během S – fáze má vyšší specifitu k Cdk2/cyklin A komplexu, zatímco během G₂ a G₂/M je specifita větší k Cdk1/cyklin B komplexu (29). Podobně jako Cdk2 před vstupem do S – fáze, je i Cdk1 před zahájením mitózy inhibičně fosforylována Wee1 kinázou na T14 a Y15.

Defosforylací na těchto místech zajišťuje CDC25B, která lokalizuje na centrosom právě při iniciální aktivaci Cdk1/cyklin B komplexu probíhající na centrosomu v profázi mitotického cyklu. Buňky injikované siRNA pro CDC25B hromadily neaktivní Cdk1 a cyklin B a jejich centrosomy byly neseparované, což značí jejich neschopnost defosforylovat Cdk1/cyklin B (31). Je tedy zjevné, že inhibice CDC25B brání průběhu mitotického cyklu. Po zahájení mitózy aktivita CDC25B postupně klesá. Její proteasom-dependentní degradace je indukována fosforylací Cdk1/cyklin A komplexem (30).

4.2.2 Kooperace CDC25A a CDC25B

V poslední době se ovšem stále více potvrzuje účast všech tří forem CDC25 fosfatáz na regulaci přechodů buněčného cyklu. Původní představa o distinktní funkci každé fosfatázy se jeví jako nesprávná podle nedávných publikací (19,31).

Metoda RNA interference byla použita ke stanovení funkcí jednotlivých CDC25 fosfatáz. Akumulaci mitotických buněk bylo zabráněno mikroinjekcí siRNA pro CDC25A i pro CDC25B, zatímco žádný rozdíl se neprojevil přítomností siRNA pro CDC25C (31). Můžeme tedy říct, že CDC25C je do jisté míry postradatelná při vstupu do mitózy. Dále kombinací siRNA pro všechny tři formy fosfatáz bylo zjištěno, že deficiencie CDC25A a B dohromady způsobuje mnohem výraznější prodlevu v G₂/M, než deficiencie každé zvlášť. Z toho lze usuzovat na spolupráci CDC25A a B při zahájení mitózy. Navíc buňky s siRNA pro CDC25B exprimovaly velké množství cyklinu A, ale velmi málo cyklinu B1, což značí potřebu CDC25B aktivity pro akumulaci cyklinu B1 a CDC25A aktivity pro akumulaci cyklinu A. Stejně jako u CDC25B, také u CDC25A siRNA buněk

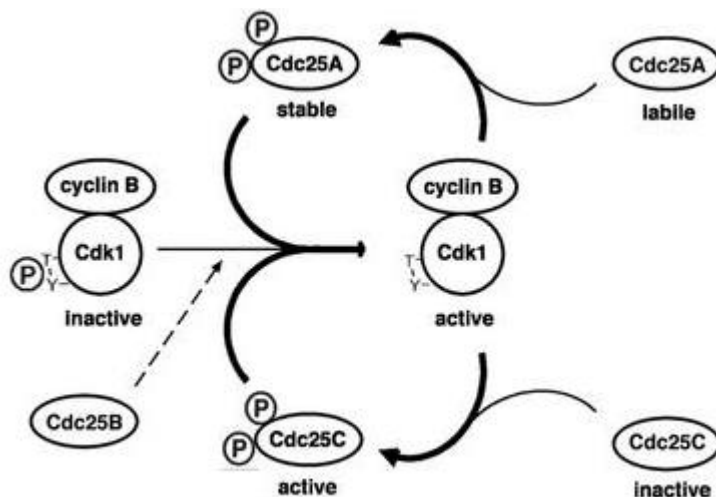
bylo pozorováno přetrvávání neaktivní formy Cdk1 nasvědčující, že obě fosfatázy vzájemně kooperují a mají každá svou roli při aktivaci Cdk1 (31).

Ačkoliv v neovlivněném buněčném cyklu se pravděpodobně na zahájení mitózy podílí všechny CDC25 fosfatázy, je zřejmé, že pokud jsou přítomné alespoň CDC25A a CDC25B, průběh mitózy nebude přerušeno. O to více překvapující jsou nedávno publikované výsledky, které ukazují, že pro normální vývoj a zahájení mitózy u myši není nezbytná CDC25C ani CDC25B. Je evidentní, že CDC25A, nebo jiné, dosud neznámé fosfatázy, je schopná kompenzovat ztrátu funkce CDC25C a CDC25B (34).

CDC25A fosfatáza je tedy kritickou pro regulaci G₂/M přechodu. S ohledem na její funkci při zahájení syntézy DNA bylo zjištěno, že narozdíl 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 S17 a S115, čímž odpráhuje CDC25A od ubiquitin-dependentní degradace (15). Negativním regulátorem CDC25A při zahájení mitózy je také CHK1, která fosforylací na S178 a T507 usnadňuje vazbu 14-3-3 proteinu. Tím je zabráněno interakci s Cdk1/cyklin B (33).

Důvodem stabilizace a přítomnosti CDC25A v G₂/M – přechodu je právě její interakce s Cdk1/cyklin B komplexem. Korelace vzájemných aktivit vedla k hypotéze o účasti CDC25A na aktivačním procesu Cdk1. V buňkách byly nejprve *in vitro* imunodepletovány všechny formy CDC25 fosfatáz, a tím znemožněna aktivace Cdk1/cyklin B komplexu. Po přidání CDC25A do lyzátu buněk byla výrazně zvýšena jejich schopnost aktivovat Cdk1/cyklin B (15). Tato skutečnost byla potvrzena také *in vivo*. Deregulace endogenní CDC25A pomocí RNAi způsobila nejen inhibici Cdk2/cyklin E komplexu a vstupu do S – fáze, ale také bránila plné aktivaci Cdk1/cyklin B komplexu, na které se nejspíš podílí všechny CDC25 fosfatázy. Důležitost účasti CDC25A na aktivaci Cdk1 také podtrhuje fakt, že prodleva v zahájení mitózy nastala i při nenarušené funkci CDC25B i C fosfatáz (15).

Pro shrnutí role CDC25 fosfatáz v G₂/M přechodu byl navržen model znázorňující možné vztahy mezi jednotlivými fosfatázami. Iniciální stimulaci Cdk1/cyklin B komplexu na centrosomu zajišťuje CDC25B. Přispívá k ní také stále ještě nestabilní CDC25A. První vlna takto aktivovaného Cdk1/cyklin B spouští pozitivní zpětnou vazbu. Fosforylací je aktivována CDC25C a stabilizována CDC25A, čímž je masivně zesílena stimulace Cdk1/cyklin B komplexu vyžadována pro zahájení mitózy (Obr.5)(15).



Obrázek 5:
Model kooperace CDC25 fosfatáz při aktivaci Cdk1/cyklin B komplexu. Převzato z (15).

4.3 Centrosom a Aurora-A

Progresi mitotického cyklu během interfáze zabraňuje centrosomální CHK1. Ta je odpovědná za inhibiční fosforylaci CDC25B fosfatázy a znemožňuje tak aktivaci Cdk1. Pro spuštění mitózy je nutné uvolnění CDC25 fosfatáz. Aktivačním upstream regulátorem CDC25B a protihračem CHK1 v G₂/M je Aurora-A kináza, která fosforyluje centrosomální CDC25B a iniciuje tak Cdk1 aktivační dráhu. Bylo prokázáno, že v Aurora-A deficientních buňkách oproti kontrolním nedochází k akumulaci cyklinu B na centrosomu, buňky jsou navíc zpožděny v G₂ – fázi (39).

V lidských buňkách se vyskytují tři typy: Aurora-A, Aurora-B a Aurora-C. Všechny plní esenciální funkce v mitotických dějích a při zajišťování integrity genomu.

Na důležitosti jí přidává také fakt, že úroveň exprese Aurora-A mRNA je vysoká v maligních nádorech, což naznačuje její onkogení charakter. Dynamicky se měnící lokalizace Aurory-A indikuje její účast v různých fázích buněčného cyklu. V S – fázi se Aurora-A poprvé objevuje na centrosomu jakmile je duplikován, ale aktivní forma je evidentní až v pozdní G₂ – fázi. Aktivita i koncentrace proteinu na centrosomu rapidně stoupá v časně fázi mitózy, určitá frakce je také translokována do jádra. Po rozpadu jaderné membrány v prometafázi je Aurora-A lokalizovaná nejen na centrosomech tvořících póly dělicího vřeténka, ale také na jeho mikrotubulech. Za lokalizaci Aurory-A na centrosom je odpovědná Plk1 kináza, zatímco TPX2 (targeting protein for Xklp2) zprostředkuje vazbu Aurory-A na mikrotubuly dělicího vřeténka (40).

Kromě vstupu do mitózy je aktivita Aurory-A vyžadována také pro maturaci a separaci centrosomů spojenou s tvorbou dělicího vřeténka a pro seřazení chromosomů v metafázi.

Maturace centrosomu zahrnuje seskupení centrosomálních proteinů a vytvoření funkčního MTOC centra. Aurora-A je k maturaci centrosomu nezbytná, protože fosforyluje TACC (transforming acidic coiled-coil) proteiny a usnadňuje tak jejich vazbu na centrosom. TACC poté tvoří komplex s XMAP215 proteinem asociovaným na mikrotubulech. Tento komplex podporuje růst mikrotubulů (35,36).

V separaci centrosomů hraje roli Eg5 molekulový motor, který je lokalizován přesně mezi zdvojené centrosomy již v pozdní S – fázi. Předpokládá se, ačkoliv to zatím nebylo potvrzeno, že Aurora-A fosforyluje Eg5 a iniciuje tak oddělení centrosomů.

Fosforylací CENP-A proteinu Aurorou-A je umožněno řádné připojení mikrotubulů dělicího vřeténka na kinetochory chromosomů a jejich seřazení v metafázní rovinu (37).

4.3.1 Fosforylace CDC25B Aurorou-A

Uvolnění a aktivace CDC25B pro zahájení mitózy vyžaduje vymizení CHK1 a naopak navázání Aurory-A na centrosom, kterou je CDC25B fosforylována na S353, jež se nachází v konsensus sekvenci rozeznávané a fosforylované Aurorou-A. Tuto fosforylací bylo možné detegovat pouze v mitotických buňkách. Centrosomální lokalizace fosforylované CDC25B byla ověřena protilátkami proti γ - a α -tubulinu. Imunofluorescenční značení aktivní Aurory-A i fosforylované CDC25B ukázalo kolokalizaci obou molekul v časně fázi mitózy na centrosom. Aktivace fosfatázy byla prokázána použitím siRNA pro Auroru-A *in vivo*, čímž došlo k dramatickému poklesu fosforylované CDC25B na centrosomu. Na druhou stranu overexprese Aurory-A způsobila předčasné zahájení mitózy (38).

4.3.2 Aktivace Aurory-A

Již od chvíle, kdy se v S – fázi duplikují centrosomy, je Aurora-A v buňce exprimována. Její aktivita se ale projevuje až v pozdní G₂ – fázi, takže mezi tím musí docházet k aktivaci Aurory-A. Pomocí dvojhybridního systému byl identifikován LIM protein Ajuba interagující s Aurorou-A na centrosomu v G₂/M přechodu (39). Ajuba obsahuje LIM-2 a LIM-3 vazebné domény zprostředkující vazbu na NH₂-terminální oblast Aurory-A, přičemž jejich interakcí dochází k tvorbě komplexu, ve kterém jsou oba proteiny fosforylovány. Inkubací Aurory-A s různými koncentracemi Ajuba proteinu vyšlo najevo, že sám Ajuba protein nefosforyluje, ale usnadňuje autofosforylací Aurory-A na T288. Efektivita autokatalytické aktivace Aurory-A závisí na koncentraci Ajuba proteinu. Ajuba deficientní buňky nejsou schopny vstoupit do mitózy stejně jako Aurora-A deficientní buňky (39).

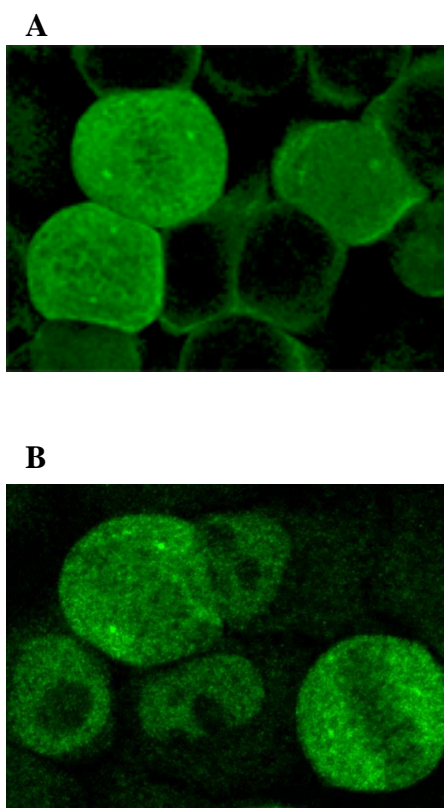
Je evidentní, že aktivace Aurora-A – Ajuba komplexu hraje významnou roli v Cdk1 aktivační dráze a je jednou z nejčasnějších impulsů pro zahájení mitózy.

4.4 Vliv PKB na regulaci mitózy

PKB kináza je klíčovým mediátorem signálních transdukčních procesů. Je zapojena v řízení buněčného cyklu, zvláště v regulaci mitózy. Před vstupem do mitotického cyklu je PKB fosforylována na dvou specifických místech, kterými jsou T308 a S473. Za fosforylaci T308 je odpovědná PDK1 (3-phosphoinositide – dependent protein kinase 1), zatímco S473 fosforyluje dosud neznámá kináza. Protilátkou proti T308 bylo ověřeno, že k aktivaci PKB dochází pouze v mitotických buňkách, kde aktivní PKB lokalizuje na centrosom (Obr.6). Po zahájení mitózy PKB aktivita opět klesá.

Podobných výsledků bylo dosaženo také v meiotickém cyklu, kde ovšem na rozdíl od cyklu mitotického PKB fosforylovaná na S473 asociuje nejen s centrosomem, ale také s jadernou membránou. Fosfo-T308 PKB byla detegována pouze na centrosomu (52).

PKB aktivita usnadňuje vstup do mitózy v několika směrech. Fosforylací CDC25B na S353 při oxidativním stresu může PKB přispívat k aktivaci Cdk1 na centrosomu (53). V interfázi brání aktivaci CDC25B fosfatázy centrosomální CHK1. Ukázalo se, že PKB lokalizovaná v mitose také na centrosom, je schopná inhibičně fosforylovat CHK1 na S280, což by mohl být pro CHK1 signál k opuštění centrosomu před zahájením mitózy (54). Byla popsána také PKB – dependentní fosforylace GSK-3 kinázy. Ta je ve své aktivní formě lokalizovaná na centrosom a póly dělicího vřeténka obdobně jako Aurora-A (51). GSK-3 fosforyluje proteiny asociované s mikrotubuly (MAPs), čímž dochází k destabilizaci mikrotubulů. V mitose je ovšem GSK-3 inhibována právě PKB kinázou, se kterou může interagovat na centrosomu. Inaktivace GSK-3 aktivity umožní mimo jiné vytvoření dělicího vřeténka. Hypoteticky může PKB stimulovat CDC25B nejen přímou fosforylací, ale také prostřednictvím



Obrázek 6: A: lokalizace T308 PKB
B: lokalizace S473 PKB
v mitotických HeLa buňkách.
(nepublikovaná data)

inhibice GSK-3, která pravděpodobně inhibuje Auroru-A, která na centrosomu aktivačně fosforyluje CDC25B (Šolc P., osobní sdělení).

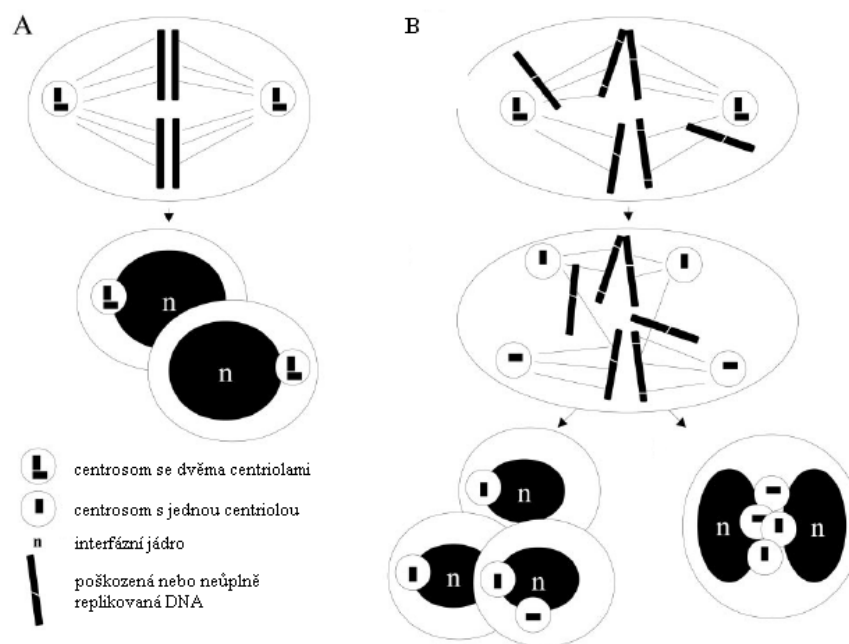
Účast PKB na regulaci mitózy je evidentně nezbytná, nicméně bude třeba ještě značného úsilí k ověření všech výše popsaných vztahů, které nejsou stále zcela objasněny.

5. Centrosom pod vlivem poškození DNA

K monitorování integrity genomu jsou buňky vybaveny kontrolními body, jako např. G₂ DNA damage checkpoint (G₂ kontrolní bod poškození DNA). Funkčními prvky těchto kontrolních bodů jsou checkpoint kinázy. U savců jsou to ATM, ATR – geny mutované při onemocnění ataxia telangiectasia. Pacienti s touto chorobou jsou extrémě citliví k radiaci a mají zvýšené predispozice k tvorbě nádorů. Tato fakta podtrhují nezbytnost těchto kináz při odpovědi na poškození DNA nebo zastavení replikace DNA. Aktivací ATM/ATR kináz vlivem genotoxického stresu je spuštěna signální dráha, ve které jsou dále aktivovány kinázy CHK1 a CHK2, které dále působí na efektorové proteiny jako jsou například p53, BRCA-1 (breast cancer associated gene 1), MDM-2 (mouse double minute 2) (41). V důsledku této signalizace dochází k pozastavení buněčného cyklu.

Poškození DNA během mitózy má za následek inaktivaci centrosomu, což bylo ověřeno na somatických buňkách i syncytiálních embryích Drosophily. Při pozorování mitotických somatických buněk v přítomnosti poškození DNA dochází k rozpadu centrosomů na jednotlivé frakce obsahující pouze jednu centriolu (42). Nutno podotknout, že k těmto změnám dochází u somatických buněk pouze v mitóze, zatímco u Drosophily i v interfázi. Výsledkem rozpadu centrosomů je formace multipolárního dělicího vřetenka, které pozbývá schopnosti správného seřazení chromosomů v metafázní rovině a jejich rovnoměrné separace (Obr.7). I přes tyto malformace centrosomu není průběh mitotického cyklu zastaven, což vede k vážným defektům v dělení buňky a k aneuploidiím (42).

Je zřejmé, že existuje dosud neznámý mechanismus, který při poškození DNA přeneše signál na centrosom a ovlivní jeho regulaci. Princip fungování tohoto mechanismu však zůstává nejasný. Je však pravděpodobné, že mutace v genech, které za normálních okolností regulují duplikaci centrosomu (jako např. p53), vede k amplifikaci centrosomů a tvorbě multipolárního dělicího vřetenka.



Obrázek 7: Rozpad centrosomů při poškození DNA během mitózy.

- A: Za kontrolních podmínek tvoří mitotické buňky bipolární dělicí vřeténko obsahující dva centrosomy lokalizované na pólech a chromosomy seřazené v metafázní rovině. Dceřiné buňky obsahují každá po jednom centrosomu se dvěma centriolami.
- B: V přítomnosti poškození DNA začíná mitóza se dvěma centrosomy na pólech dělicího vřeténka, ale chromosomy nejsou seřazené v metafázní rovině. V časně fázi mitózy dochází k oddělení centriol a vytvoření multipolárního dělicího vřeténka. Po výrazné prodlevě může dojít k cytokinezi a ke vzniku více než dvou aneuploidních dceřiných buněk nebo pouze jedné buňky s více jádry a s několika neúplnými centrosomy.. Převzato z (42).

V syncytiálních embryích *Drosophily* vedou poruchy DNA při mitóze také k defektům dělicího vřeténka a k narušení centrosomu, provázené ztrátou centrosomálních proteinů. Na rozdíl od somatických buněk, je zde vyžadována přítomnost CHK2 kinázy, respektive jejího homologu DmCHK2. DmCHK2 je u *Drosophily* aktivován při poškození DNA a lokalizuje na centrosom (43).

V důsledku těchto změn odpadá jádro od kortikální membrány syncytiálního embrya a neúčastní se dalšího vývoje embrya. Mutantní forma DmCHK2 naopak blokuje tento mechanismus, který vyřazuje defektní jádro. Centrosomální cyklus je tedy propojen se signálními dráhami aktivovanými při genotoxickém stresu DmCHK2 kinázou, která iniciuje inaktivaci centrosomu a zajišťuje tak integritu genomu (43).

CHK2 je také upstream regulátorem p53 proteinu, který se účastní procesu duplikace centrosomu, takže je možné, že CHK2 působí inaktivaci centrosomu přes p53. Nicméně některé typy poškození DNA, které aktivují p53, neaktivují CHK2, tudíž p53 může být aktivován i bez přítomnosti CHK2 kinázy. Ta ovšem působí i na jiné substráty kromě p53,

takže můžeme říci, že absencí jednoho z těchto hráčů není přerušena signální dráha zajišťující adekvátní odpověď na poškození DNA (41).

V savčích buňkách je aktivní CHK2 lokalizována na centrosom pouze při poškození DNA, které indukuje její fosforylaci na T387 (26). Účinek CHK2 kinázy je zde velmi podobný tomu, který byl popsán u *Drosophily*. Zdá se, že centrosomální CHK2 přispívá k inhibici Cdk1, a brání tak zahájení mitosy. Tím je podpořena hypotéza o kooperaci CHK1 a CHK2, kde CHK1 funguje jako hlavní fyziologický inhibitor Cdk1, zatímco CHK2 přispívá svou aktivitou pouze při poškození DNA (41).

Polo-like kinázy Plk1 a Plk3 jsou také součástí regulačních drah vázaných na centrosom, které ovlivňují buněčný cyklus. Tyto kinázy jsou regulovány ATM – dependentní signální dráhou, aktivovanou například zastavením replikace DNA. Plk1 je působením ATM inhibována, přičemž přidání caffeinu tuto inhibici může opět zrušit (44). BRCA-1 a p53 jsou také substráty ATM, ale na rozdíl od Plk1 jsou fosforylovány v SQ/TQ regulační doméně, obsahující četná fosforylační místa pro ATM, kterou Plk1 nemá. Z toho lze usuzovat, že Plk1 je nejspíš inhibována prostřednictvím CHK1 a CHK2.

Plk3 je na druhou stranu ATM – dependentní dráhou aktivována. Má důležitou roli v odpovědi na různé druhy genotoxického stresu a při spuštění apoptózy. Je možné, že se svou lokalizací na centrosom účastní regulace růstu mikrotubulů a duplikace centrosomu. Interakce Plk3 a p53 umožňuje fosforylaci p53 na S20, která vede k aktivaci této molekuly (45). K fosforylaci p53 přispívá také CHK2, která může Plk3 aktivovat. Je pravděpodobné, že k této aktivaci dochází právě na centrosomu. Plk3 propojuje dráhy senzitivující poškozenou DNA a přispívá k odpovědi buňky na genotoxický stres.

6. Závěr

V poslední době se objevuje nový pohled na centrosom jako jedno z řídicích center integrující pozitivní i negativní signální dráhy, které ovlivňují progresi buněčného cyklu (55). Ukazuje se, že centrosom je nezbytný pro G₁/S i G₂/M přechod, kde slouží jako meeting-point (místo setkání) regulačních proteinů, jejichž interakce je lokalizací na centrosom výrazně usnadněna. V tomto směru má centrosom značný vliv na průběh a regulaci buněčného cyklu. S ohledem na množství s centrosomem asociovaných proteinů lze očekávat stále rostoucí počet jeho regulačních funkcí v životním cyklu buňky.

7. Přehled literatury

(citace jsou seřazeny přibližně tak, jak po sobě následují v textu)

1. **Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and J. D. Watson.** (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4rd ed. Garland Publishing, New York and London
2. **Doxsey, S., Zimmerman, W., Mikule, K.** (2005) Centrosome control of the cell cycle *Trends Cell Biol.* 15(6): 303–311.
3. **Doxsey, S.** (2001) Re-evaluating centrosome function *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 688-698.
4. **Tsou, M.B. and Stearns, T.** (2006) Controlling centrosome number: Licenses and blocks *Current Opinion in Cell Biology* 1: 74-78.
5. **La Terra, S., English, C.N., Hergert, P., McEwen, B.F., Sluder, G. and A. Khodjakov** (2005) The *de novo* centriole assembly pathway in HeLa cells: cell cycle progression and centriole assembly/maturation *J Cell Biol* 168: 713–722.
6. **Lacey, K. R., Jackson, P. K. & Stearns, T.** (1999) Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96: 2817–2822.
7. **Hinchcliffe, E.H. et al.** (2001) Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase *Science* 291: 1547–1550.
8. **Mayor, T., Hacker, U., Stierhof, Y. D., and Nigg, E. A.** (2002) The mechanism regulating the dissociation of the centrosomal protein C-Nap1 from mitotic spindle poles *J. Cell Sci.* 115: 3275-3284.
9. **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 *EMBO J.* 13: 4302-4310.
10. **Matsumoto Y, Maller JL** (2004) A centrosomal localization signal in cyclin E required for CDK2-independent S phase entry *Science* 306: 885–888.
11. **Sherr, C. J., and J. M. Roberts** (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases *Genes Dev.* 18: 2699-2711.
12. **Grana, X., and E. P. Reddy** (1995) Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin-dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs) *Oncogene* 11: 211-219.
13. **Nishimura, T., Takahashi, M., Kim, H.S., Mukai, H., and Ono, Y.** (2005) Centrosome-targeting region of CG-NAP causes centrosome amplification by recruiting cyclin E-cdk2 complex *Genes Cells* 10: 75–86.

14. **Qu, Z., Weiss, J. N. and W. R. MacLellan** (2003) Regulation of the mammalian cell cycle: a model of the G₁-to-S transition *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284: C349–C364.
15. **Mailand, N., Podtelejnikov, A., Groth, A., Mann, M., Bartek, J. & Lukas, J.** (2002) Regulation of G₂/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability *EMBO J.* 21: 5911–5920.
16. **Bartek, J., Lukas, C., Lukas J.** (2004) Checking on DNA damage in S phase *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 792–804.
17. **Busino L, Chiesa M, Draetta GF, Donzelli M.** (2004) Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis *Oncogene* 23: 2050–2056.
18. **Lukas, J., Bartkova, J., Rohde, M., Strauss, M. and Bartek, J.** (1995) Cyclin D1 is dispensable for G₁ control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity *Mol. Cell. Biol.* 15: 2600–2611.
19. **Boutros, R., Dozier, C., and Ducommun, B.** (2006) The when and wheres of CDC25 phosphatases *Current Opinion in Cell Biology* 18(2): 185-91.
20. **Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA.** (2004) Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts *Trends Biochem Sci.* 29: 233–242.
21. **Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, et al.** (2002) PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G₁ arrest *Nat Med* 8: 1153–1160.
22. **Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ.** (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization *Genes Dev.* 21: 3499–3511.
23. **Perez-Mongiovi, D., Beckhelling, C., Chang, P., Ford, C.C., and Houlston, E.** (2000) Nuclei and microtubule asters stimulate maturation/M phase promoting factor (MPF) activation in *Xenopus* eggs and egg cytoplasmic extracts *J. Cell Biol.* 150: 963-974.
24. **Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E. A., and Pines, J.** (2003) Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase *Nat. Cell Biol.* 5: 143-148.
25. **Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., Shinya, N., Iwamatsu, A. and E. Nishida** (2001) Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase *Nature* 410: 215-220.
26. **Krämer, A., Mailand, N., Lukas, C., Syljuåsen, R.G., Wilkinson, C.J., Nigg, E.A., Bartek, J. & Lukas, J.** (2004) Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase *Nat. Cell Biol.* 6(9): 884-91.

27. **Jin, P., Hardy, S. and D. O. Morgan.** (1998) Nuclear localization of cyclin B1 controls mitotic entry after DNA damage *J. Cell Biol.* 141: 875-885.
28. **Mitra, J., and G.H. Enders** (2004) Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells *Oncogene.* 23: 3361–3367.
29. **Lammer, C., Wagerer, S., Saffrich, R., Mertens, D., Ansorge, W., and Hoffmann, I.** (1998) The cdc25B phosphatase is essential for the G₂/M phase transition in human cells *J. Cell Sci.* 111: 2445-2453.
30. **Baldin V., Cans C., Knibiehler M. & Ducommun B.** (1997) Phosphorylation of human CDC25B phosphatase by CDK1–cyclin A triggers its proteasome-dependent degradation *J. Biol. Chem.* 272: 32731–32734.
31. **Lindqvist, A., Källström, H., Lundgren, A., Barsoum, E., and Karlsson, C.R.** (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(1): 35-45.
32. **Donzelli, M., Squatrito, M., Ganoth, D., Hershko, A., Pagano, M. and G. F. Draetta** (2002) Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase *EMBO J.* 21: 4875-4884.
33. **Chen, M.S., Ryan, C. E. and H. Piwnica-Worms** (2003) Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding *Mol. Cell. Biol.* 23: 7488-7497.
34. **Ferguson, A.M., White, L.S., Donovan, P.J., and H. Piwnica-Worms** (2005) Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatases *Mol. Cell. Biol.* 25(7): 2853-60.
35. **Marumoto, T., Zhang, D., and Saya, H.** (2005) Aurora-A—a guardian of poles *Nat. Rev. Cancer* 5: 42–50.
36. **Dutertre, S., S. Descamps, and C. Prigent** (2002) On the role of aurora-A in centrosome function *Oncogene* 21: 6175-6183.
37. **Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Honda, S., Kobayashi, O., Hatakeyama, K., Ushio, Y., Saya, H. and T. Hirota** (2003) CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function *Dev. Cell* 5: 853-864.
38. **Dutertre S., Cazales M., Quaranta M., Froment C., Trabut V., Dozier C., Mirey G., Bouche J. P., Theis-Febvre N., Schmitt E., et al.** (2004) Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G₂–M transition *J. Cell Sci.* 117: 2523–2531.

39. **Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K. and Saya H.** (2003) Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells *Cell* 114: 585-598.
40. **De Luca, M., Lavia, P., and Guarguaglini, G.** (2006) A Functional Interplay Between Aurora-A, Plk1 and TPX2 at Spindle Poles: Plk1 Controls Centrosomal Localization of Aurora-A and TPX2 Spindle Association *Cell Cycle* 5(3): 296-303.
41. **Bartek, J., Lukas J.** (2003) Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer *Cancer Cell* 3: 421-9.
42. **Hut, H.M.J., Lemstra, W., Blaauw, E. H., Van Cappellen, G. W., Kampinga, H. H., and Sibon, O.C.M.** (2003) Centrosomes split in the presence of impaired DNA integrity during mitosis *Mol. Biol. Cell* 14: 1993-2004.
43. **Takada, S., Kelkar, A., and Theurkauf, W. E.** (2003) Drosophila checkpoint kinase 2 couples centrosome function and spindle assembly to genomic integrity *Cell* 113: 87-99
44. **Van Vugt, M. A., Smits, V. A., Klompaker, R., and Medema, R. H.** (2001) Inhibition of Polo-like kinase-1 by DNA damage occurs in an ATM- or ATR-dependent fashion *J. Biol. Chem.* 276: 41656-41660.
45. **Xie, S., Wu, H., Wang, Q., Kunicki, J., Thomas, R.O., Hollingsworth, R. E., Cogswell, J. and W. Dai** (2002) Genotoxic stress-induced activation of Plk3 is partly mediated by Chk2 *Cell Cycle* 1: 424-429.
46. **Piel, M., Nordberg, J., Euteneuer, U. and Bornens, M.** (2001) Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells *Science* 291: 1550-1553.
47. **Sheaff, R.J., Groudine M., Gordon M., Roberts, J.M., Clurman, B.E.** (1997) Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1 *Genes Dev.* 11: 1464-1478.
48. **Bartek, J., Lukas, J.** (2001) Mammalian G₁- and S-phase checkpoints in response to DNA damage *Curr. Opin. Cell Biol.* 13(6): 738-747.
49. **Chandramohan, V., Jeay, S., Pianetti, S., Sonenshein G.E.** (2004) Reciprocal control of Forkhead box O 3a and c-Myc via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway coordinately regulates p27Kip1 levels *J. Immunol* 172: 5522-5527.
50. **Anger, M., Klima, J., Kubelka, M., Prochazka, R., Motlik, J., Schultz, R.M.** (2004) Timing of Plk1 and MPF activation during porcine oocyte maturation *Mol. Reprod. Dev.* 69(1): 11-6.

51. **Wakefield, J.G., Stephens, D.J. and Tavaré, J.M.** (2003) A role for glycogen synthase kinase-3 in mitotic spindle dynamics and chromosome alignment *J. Cell Sci.* 116: 637–646.
52. **Kalous, J., Solc. P., Baran, V., Kubelka, M., Schultz, R.M., Motlik, J.** (2006) PKB/AKT is involved in resumption of meiosis in mouse oocytes. *Biol Cell* 98(2): 111-23.
53. **Baldin, V., Theis-Febvre, N., Benne, C., Froment, C., Cazales, M., Burlet-Schiltz, O. and Ducommun, B.** (2003) PKB/Akt phosphorylates the CDC25B phosphatase and regulates its intracellular localization *Biol. Cell.* 95: 547-554.
54. **King, F.W., Skeen, J., Hay N. and Emma Shtivelman** (2004) Inhibition of Chk1 by activated PKB/Akt *Cell Cycle* 3(5): 634-7.
55. **Krämer, A., Lukas, J., Bartek, J.** (2004) Checking out the centrosome *Cell Cycle* 3(11): 1390-3.