

Charles University in Prague

Faculty of Science

Department of Genetics and Microbiology

PhD study program: Molecular and Cellular Biology, Genetics and Virology



Jan Benada, MSc

Molecular mechanisms of checkpoint signalling and termination

Molekulární mechanismy kontrolních bodů
buněčného cyklu a jejich ukončení

Ph.D. Thesis - autoreferát

Supervisor: Libor Macurek, MD, PhD

Laboratory of Cancer Cell Biology; Institute of Molecular Genetics of the ASCR

Prague, 2016

Doktorské studijní programy v biomedicíně, Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky;

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie;

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc.

S disertací je možno se seznámit v knihovně přírodovědecké fakulty UK v Praze.

Content

1. Abstract	6
2. Introduction	7
2.1. DNA damage response and cell cycle checkpoints	7
2.1.1. G1 checkpoint signaling	7
2.1.2. S-phase and G2/M checkpoint signaling	8
2.2. DNA damage response is interconnected with DNA repair	9
2.3. Checkpoint Recovery	10
2.3.1. Wild-type p53-induced phosphatase 1 - Wip1	10
2.3.1.1. Role of Wip1 in checkpoint recovery	11
3. Aims of the study	12
4. List of methods	12
5. Discussion	13
5.1. Downregulation of Wip1 phosphatase modulates the cellular threshold of DNA damage signalling in mitosis	13
5.2. Polo-like kinase 1 inhibits DNA damage response during mitosis	14
5.3. Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint.	15
5.4. Inhibition of WIP1 phosphatase sensitizes breast cancer cells to genotoxic stress and to MDM2 antagonist nutlin-3	17
6. Conclusions	19
7. Curriculum vitae	21
8. List of publications	23

9. Abstrakt	24
10. Úvod	25
10.1. Poškození DNA a kontrolní body buněčného cyklu	25
10.1.1. Signalizace kontrolního bodu v G1 fázi buněčného cyklu	25
10.1.2. Signalizace kontrolního bodu v S fázi a G2/M přechodu	26
10.2. Odpověď na poškození DNA je úzce propojena s mechanizmy opravy DNA	27
10.3. Ukončení kontrolních bodu buněčného cyklu	28
10.3.1. Wild-type p53-induced phosphatase 1 - Wip1	28
10.3.1.1. Úloha Wip1 v ukončení kontrolních bodu	28
11. Cíle práce	30
12. Přehled metod	30
13. Diskuze	31
13.1. Inhibice funkce Wip1 moduluje buněčnou signalizaci na poškození DNA v mitóze	31
13.2. Polo-like kináza 1 inhibuje buněčnou odpověď na poškození DNA v průběhu mitózy.	32
13.3. Aktivační (Gain-of-function) mutace PPM1D/Wip1 vedou k porušení kontrolního bodu G1 fáze	33
13.4 Inhibice fosfatázy Wip1 senzitivizuje buňky odvozené z rakoviny prsu ke genotoxickému stresu a k antagonistu MDM2 nutlinu-3	34
14. Závěr	36
15. Curriculum vitae (CZ)	37
16. Publikace	40
17 References/Reference	41

1. Abstract

Cells employ an extensive signalling network to protect their genome integrity, termed DNA damage response (DDR). The DDR can trigger cell cycle checkpoints which prevent cell cycle progression and allow repair of DNA damage. The failures in these safeguarding mechanism are represented by serious human malignancies, most predominantly by cancer development. This work aims to contribute to the understanding of how do the cells negatively regulate DDR and cell cycle checkpoint signalling. We focused mainly on Wip1 (*PPM1D*) phosphatase, which is a major negative regulator of DDR and is indispensable for checkpoint recovery. Firstly, we have shown that Wip1 is degraded during mitosis in APC-Cdc20 dependent manner. Moreover, Wip1 is phosphorylated at multiple residues during mitosis, resulting in inhibition of its enzymatic activity. We suggest that the abrogation of Wip1 activity enables cells to react adequately even to low levels of DNA damage encountered during unperturbed mitosis. In the following publication, we have investigated why the mitotic cells trigger only early events of DDR and do not proceed to the recruitment of DNA repair factors such as 53BP1. We showed that 53BP1 is phosphorylated within its ubiquitination-dependent recruitment domain by CDK1 and Plk1. These phosphorylations prevents 53BP1 to bind ubiquitinated histones, to localize to the sites of DNA damage and ultimately hampers DNA repair. In included unpublished results we showed that Wip1 is phosphorylated upon genotoxic stress by MK2 and p38 kinases. The functional relevance of these modifications still remains to be elucidated. In next part, we identified novel gain-of-function mutations of *PPM1D* which result in expression of C-terminally truncated Wip1. The truncated Wip1 retains its catalytic activity, while exhibit increased protein stability. As result, cells have more of catalytically active Wip1, that efficiently shut down the p53-dependent G1 checkpoint. These mutations were identified in cancer cell lines U2OS and HCT116 and importantly also in peripheral blood of breast and colorectal cancer patients. We propose that these mutations could predispose to cancer development. Finally, we showed *in vitro* that inhibition of Wip1 by small molecule drug GSK2830371 specifically sensitizes breast cancer cells with amplified *PPM1D* and wild-type p53 to chemotherapy treatment with DNA damaging drugs and to Mdm2 antagonist such as Nutlin3. In conclusion, the results obtained during the work on this thesis contribute to our knowledge of how the cells negatively regulate DDR. We believe that better understanding to molecular regulation of DDR will eventually lead to better diagnostics and to development of more targeted cancer treatments.

2. Introduction

2.1. DNA damage response and cell cycle checkpoints

DNA damage, particularly in form of double-strand breaks, represent a serious danger to the maintenance of genome integrity. The broken DNA cannot be correctly replicated nor properly segregated into daughter cells. To cope with DNA damage eukaryotic cells evolved sophisticated mechanisms which allow them to stop cell cycle progression (so-called checkpoints), repair the damaged DNA and then eventually re-enter the cell cycle and continue to proliferate (also termed checkpoint recovery). Alternatively, if the damage is too severe to be repaired, cells can permanently stop in cell cycle (senescence) or trigger programmed death (apoptosis). The failures in safeguarding mechanism of DNA damage response and in tight control of cell division are represented by serious human malignancies, most predominantly by cancer development (Jackson and Bartek, 2009).

2.1.1. G1 checkpoint signaling

During the G1 phase the DNA double-strand breaks activate ATM signaling. ATM phosphorylates and thus activates diffusible effector kinase Chk2 on threonine 86 (Schwarz et al., 2003). Fully activated Chk2 spreads the DDR signaling further through the nucleus. Among other substrates, Chk2 phosphorylates a CDK activatory phosphatase Cdc25A on serine 76. Phosphorylated Cdc25A is subsequently ubiquitinated by SCF/bTrCP ubiquitin ligase complex and destined to degradation (Mailand et al., 2000).

The maintenance of arrested state is facilitated by a slower transcriptional response that crucially depends on tumour suppressor p53. Both ATM and Chk2 phosphorylate p53 within its N-terminus (at serine 15 and threonine 18 and serine 20, respectively), which results in its stabilization (Canman and Lim, 1998; Khanna et al., 1998; Shieh et al., 2000). The p53 acts as a master transcriptional regulator of both cell cycle progression and cell death. From perspective of G1 checkpoint its most important transcriptional target is p21.

The p21 binds CDK4/6-cyclin D and CDK2-cyclin E complexes and blocks progression through cell cycle. The loss of either p53 or p21 results in abrogation of G1 checkpoint (Abbas and Dutta, 2009). The importance of p53 is reflected by the fact that p53 is most frequent mutated tumor-suppressor in cancer.

2.1.2. S-phase and G2/M checkpoint signaling

The emergence of sister chromatids during S-phase enables cells to shift from error-prone repair via NHEJ of some DSBs to precise repair via homologous recombination (HR). This shift in DNA repair is interconnected with extensive processing of DNA broken ends and distinctive DNA damage response. The Mre11 and CtIP endonuclease resect the DNA ends, producing a 3' ssDNA overhang (Jazayeri et al., 2006; Sartori et al., 2007). The ssDNA generated during the resection triggers the ATR/Chk1/Wee1 signalling pathway. ATR/Chk1/Wee1 signalling is activated also by stretches of ssDNA which arise during the DNA replication and particularly during the replication stress at stalled replication forks. Here, the ATR/Chk1/Wee1 signalling is essential as it keeps the level of endogenous replication stress under tight control and ensure a proper DNA replication rate during the S-phase progression.

ATR phosphorylates C-terminal regulatory domain of Chk1 on several SQ/TQ sites, including serine 317 and 345 that are assumed to be crucial for Chk1 activation (Liu et al., 2000). Chk1 phosphorylates Cdc25A on serine 76 (Kasahara et al., 2010). Phosphorylated Cdc25A is subsequently ubiquitinated by SCF/bTrCP ubiquitin ligase complex and destined to degradation (Busino et al., 2003; Jin et al., 2003).

Chk1 also phosphorylates and thus prevent form actions CDC25B and Cdc25C phosphatases. Cdc25B is phosphorylated on serine 323, this site is then bound by 14-3-3 that blocks Cdc25B catalytic site and inhibits its activity (Forrest and Gabrielli, 2001). Cdc25C phosphorylated on serine 216 is recognized by 14-3-3 and sequestrated into cytoplasm, which averts its actions against nuclear CDK (Graves et al., 2001).

The p53/p21 axis acts again G2 and contributes to the checkpoint signalling, however the G2/M checkpoint does not strictly depends on p53 as opposed to G1 checkpoint (Bunz et al., 1998). While ATM/Chk2 plays a role in initiation of checkpoint, it is the ATR/Chk1 signalling which is indispensable prolonged G2/M checkpoint maintenance (Liu et al., 2000; Painter and Young, 1980; Rainey et al., 2008; Shibata et al., 2010; Takai et al., 2000). In addition to inhibition of CDC25 phosphatases by Chk1 and direct inhibition of CDK1 by Wee1, checkpoint signaling also targets Plk1 and its co-activators Aurora kinase A and Bora (Krystyniak et al., 2006; Qin et al., 2013; Smith, 2000).

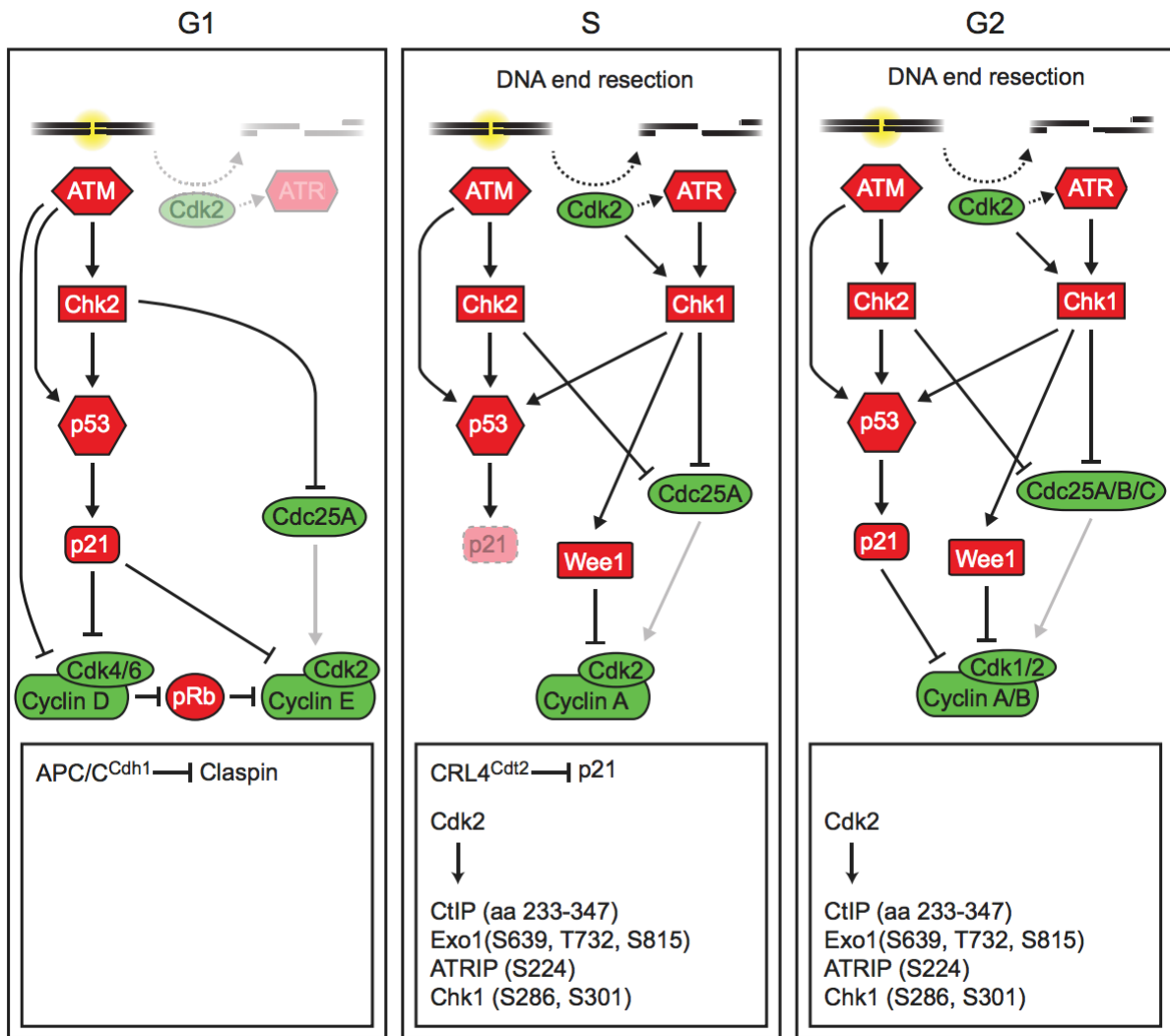


Figure 3.: Comparison of DNA damage response and cell cycle checkpoint signalling in different phases of cell cycle - G1 checkpoint depends crucially on ATM-Chk2-p53-p21 pathway. On contrary in S phase the p21-dependent response is absent and checkpoint is further promoted by ATR-Chk1-Wee1 signalling. In G2, although the ATM-Chk2-P53-p21 contributes to the checkpoint, major role plays again ATR-Chk1-Wee1 signalling. For further details see text above (adapted with modifications from (Shaltiel et al., 2015).

2.2. DNA damage response is interconnected with DNA repair

DNA damage response signalling is closely interconnected with the DNA repair machinery. Prior to DNA repair, the chromatin in the vicinity of the DNA lesions is extensively modified by several types of posttranslational modifications. These PTMs then serves as platforms for efficient accumulation of DNA repair proteins. In addition to ATM/ATR-dependent phosphorylation of chromatin proteins, the protein ubiquitination plays major signaling role in DNA repair (Doil et al., 2009).

The 53BP1 is a bivalent reader of chromatin modifications. The ubiquitination-dependent recruitment (UDR) motif of 53BP1 binds the Lys63-linked monoubiquitination of H2A at K13 and K15 (Fradet-Turcotte et al., 2013). Additionally, 53BP1 contains Tudor domain which recognize dimethylated histone H4K20-me2 (Botuyan et al., 2006; Sanders et al., 2004).

BRCA1 itself does not contain any MIUs, but it associates with ubiquitinated histones through interaction with adaptor proteins Abraxas and RAP80, where RAP80 provides MIUs for BRCA1-Abraxas-RAP80 complex (Wang et al., 2007). While 53BP1 promotes the DNA repair through non-homologous end-joining, BRCA1 stimulates repair via homologous recombination. There is antagonistic relationship between 53BP1 and BRCA1 which orchestrates repair pathway choice. 53BP1 interacting protein Rif1 blocks the binding of Brca1 to sites of DSBs in G1. Conversely, Brca1 prevents the interaction between 53BP1 and Rif1 in S/G2 (Chapman et al., 2013; Di Virgilio et al., 2013; Escribano-Diaz et al., 2013; Zimmermann and de Lange, 2014; Zimmermann et al., 2013).

2.3. Checkpoint Recovery

Once cells successfully repair the damaged DNA, it is desirable to re-enter cell cycle and to continue in proliferation. This process is termed checkpoint recovery. As described above checkpoint signaling depends heavily on post-translation modification and protein phosphorylation in particular. The critical step in checkpoint recovery is reversal of these modification. Several protein phosphatase has been proposed to play role in dephosphorylation of checkpoint components and it seems that they can act in redundant manner (Lee et al., 2014; Shaltiel et al., 2014). Here will focus on role of Wip1 phosphatase.

2.3.1. Wild-type p53-induced phosphatase 1 - Wip1

Wip1 is a magnesium-dependent serine/threonine monomeric phosphatase that belongs to the protein phosphatase 2C (PP2C) family (Fiscella et al., 1997). The Wip1 protein (605aa) consist of two major domains – N-terminal domain, which comprise of PP2C catalytic domain (1-372 aa) and noncatalytic C-terminal domain (376-605 aa; (Yoda et al., 2006). Within the otherwise conserved PP2C catalytic domain of Wip1 resides an unique positively charged segment, termed B-loop (235–268 aa). The B-loop has been reported to be crucial for Wip1 substrate specificity (Chuman et al., 2009; Yamaguchi et al., 2007). Importantly, the B-loop is bound by an allosteric Wip1 inhibitor GSK2830371 (Gilmartin et al., 2014). C-terminal domain is unique for Wip1 and its functional relevance remains unknown.

2.3.1.1. Role of Wip1 in checkpoint recovery

Wip1 exhibits specificity toward two different motives – to pSQ/pTQ and to pTXpY. SQ/TQ motif is phosphorylated by ATM and ATR kinases. Wip1 therefore counteract the activate DDR signaling on multiple levels and dephosphorylate virtually all major players in DDR – including ATM, gH2AX, Chk1, Chk2 and most importantly p53 itself. In addition to inhibition of upstream p53 activators, Wip1 also remove inhibitory phosphorylations from Mdm2, further leading to p53 (Van Maerken et al., 2009, figure 2009).

Lindquist et al., further demonstrated that in Wip1-depleted cells p53 signaling is able to downregulate cyclin B levels below threshold that is needed for preserving the minimal CDK1-cyclin B1 activity, which is needed to maintain recovery competence (Lindquist et al., 2009). To conclude, Wip1 acts as homeostatic regulator of DDR by dephosphorylating the substrates of ATM/ATR kinases, most importantly it counterbalances p53-dependet repression of CDK1 signalling and thus ensures checkpoint recovery competence.

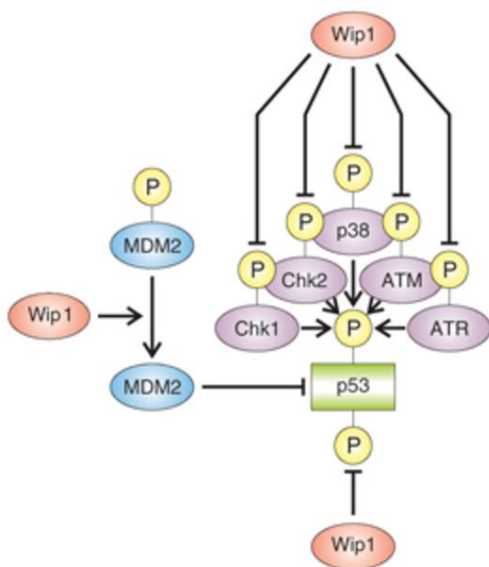


Figure 10. Inactivation of p53 represents a major function of Wip1.

Wip1 dephosphorylates and thus inactivates upstream activators of p53 - ATM, ATR, Chk1, Chk2, p38. Moreover, Wip1 also remove inhibitory phosphorylations from Mdm2, further leading to p53 downregulation. At least but not last Wip1 directly dephosphorylates p53 itself. Adapted with modifications from (Van Maerken et al., 2009).

3. Aims of the study

This work aims to contribute to the understanding of how do the cells negatively regulate DNA damage response and cell cycle checkpoint signalling. We focused mainly on Wip1 (*PPM1D*) phosphatase, which is a major negative regulator of DNA damage and is indispensable for checkpoint recovery. While the role of Wip1 in the regulation of DNA damage has been established in numerous studies, its regulation remains largely unexplored. During the work on this thesis, we were also interested in the regulation of DNA damage during the mitosis. There is an increasing amount of evidence that DNA damage response is organized differentially in mitosis compared to interphase. Nonetheless, the underlying molecular mechanisms remains poorly understood.

Specific aims of this thesis can be summarized as follows:

- **Characterize the regulation of Wip1 phosphatase during the cell cycle.**
- **Investigate the negative regulation of DNA damage response in mitosis, with the focus on post-translational modifications of 53BP1.**
- **Characterize the newly identified mutations of *PPM1D* (Wip1) on a molecular level.**
- **Describe the effect of Wip1 inhibition in cancer cell lines.**
- **Determine the functional relevance of mutual regulation between Wip1 and p38/MK2 pathway upon genotoxic stress**

4. List of methods

Molecular cloning and standard molecular biology techniques

RNA isolation, cDNA synthesis and quantitative RT-PCR

Standard biochemistry techniques including SDS-PAGE, immunoblotting, immunoprecipitations

Tissue cultures, plasmid and siRNA transfections, preparation of stable cell lines

Cell fractionation

Immunocytochemistry

Fluorescence microscopy, live-cell microscopy, confocal microscopy, laser micro-irradiation, high-content & high-throughput microscopy and corresponding image analysis

Flow cytometry

5. Discussion

5.1. Downregulation of Wip1 phosphatase modulates the cellular threshold of DNA damage signalling in mitosis

The role of Wip1 as a major negative regulator of DNA damage response has been established in numerous studies. Nonetheless, the regulation of Wip1 itself remained largely unknown. In the presented study, we have investigated how is the Wip1 regulated during the cell cycle progression.

We have shown that protein levels of Wip1 gradually increases from G1 to G2 phase. The increase of Wip1 might reflect that as Wip1 can be induced by various stress stimuli, including the endogenous stress that occurs even in unperturbed S-phase. The higher level of Wip1 in G2 phase may be functionally relevant. Even though that Wip1 is not essential for mitotic entry, its depletion results in delayed mitotic entry (Lindqvist et al., 2009). We could hypothesize that increased Wip1 levels counterbalance the ATR and eventually ATM activity that was induced during replication and DNA breakage.

Upon the mitotic entry, the Wip1 levels drop down rapidly. We have demonstrated that this decrease is caused by the degradation of Wip1 protein as the levels of Wip1 mRNA remained unaltered between G2 and M. Moreover, the decrease of Wip1 levels was prevented by treatment with proteasomal inhibitor MG132. Finally, we tested which ubiquitin ligase is responsible for Wip1 degradation. We aimed for SCF and APC-Cdc20 complexes as both of these are active early in mitosis. We have demonstrated that depletion of Cdc20 resulted in stabilization of Wip1 levels as opposed to depletion of SCF components. Taken together we propose that Wip1 is degraded by the proteasome in mitosis in APC-Cdc20 dependent manner.

In addition to the degradation, we have found that Wip1 protein is extensively phosphorylated during the mitosis. We have shown that Serine 40 is major phosphosite of CDK1. As the mutation analysis of Serine 40 did not reveal any apparent phenotype, we extended the mutational analysis to other 7 residues within the catalytic domain that have been identified in the mass-spec analysis of mitotic phosphoproteome. Strikingly, the 7D phosphomimetic mutant lost the phosphatase activity. We were unable to resolve whether the endogenous Wip1 phosphorylation is required for its subsequent degradation or not. Alternatively, the phosphorylation dependent inactivation of Wip1 may cooperate with its degradation to ensure that that Wip1 activity is completely removed from mitosis.

To investigate the functional relevance of Wip1 degradation we established a tetracycline inducible system that allows us to induce high levels of Wip1 during the mitosis. We have observed no

defects in the timing of mitotic progression, cytokinesis, nor any defects in spindle assembly upon induction of catalytically active Wip1 (data not shown).

Next, we focused on how the ectopic expression of Wip1 would affect the DNA damage response in mitosis. Notably, in contrast to interphase, mitotic cells trigger only very early events of DDR but do not proceed to the later activation of checkpoint kinases nor to the recruitment of repair factors. Induction of double-strand breaks during mitosis leads to activation of ATM, subsequent phosphorylation of H2AX and recruitment of MDC1 but later phases of response are actively inhibited by multiple mechanisms (Giunta et al., 2010; Nelson et al., 2009).

We hypothesized that the removal of Wip1 may allow the persistence of the γ H2AX marks on damaged DNA through the mitosis to subsequent G1 phase, where they can be further processed to efficient repair. Even though the G2/M checkpoint prevents the cell from entering into mitosis with damaged DNA, cells are still able to do so in presence of few DNA breaks (Harrison and Haber, 2006)(Harrison and Haber et al., 2006).

Alternatively, DNA damage could arise directly in mitosis and even without exogenous perturbations. Lukas et al. showed that unresolved replication intermediates that arise during the normal replication and to larger extent upon replication stress are converted to DNA breaks during the mitotic progression. The mechanism of this conversion to breaks may be attributed to chromatin induced ruptures or to aberrant resolution of ultra-fine chromatin bridges. Subsequently, these lesions are transmitted to daughter cells, where they become shielded by 53BP1 nuclear bodies (Lukas et al., 2011).

We have shown that forced expression of Wip1 leads to an approximately two-fold reduction of γ H2AX foci number in mitosis. Correspondingly, we have also observed similar decrease in a number of 53BP1 bodies in subsequent G1 phase. In conclusion, we propose that combination of proteasome degradation and phosphorylation-mediated inhibition of Wip1 enables the fine-tuned sensing of DNA damage that arises during unperturbed mitosis and allows the persistence of early chromatin marks of the lesions to the subsequent G1 phase where the repair of DNA can continue.

5.2. Polo-like kinase 1 inhibits DNA damage response during mitosis

As described above DNA damage response and DNA repair is organized differentially during interphase and in mitotic cells. In the presented study, we have investigated the molecular mechanism underlying the question why do not mitotic cells proceed to the recruitment of repair factors, such as 53BP1, during the mitosis and wait with the DNA repair to subsequent G1.

The 53BP1 protein is a bivalent reader of chromatin posttranslational modifications. The ubiquitination-dependent recruitment (UDR) motif of 53BP1 binds the RNF168-dependent

monoubiquitination of H2A at K13 and K15. In addition, 53BP1 contains Tudor domain that recognizes dimethylated histone H4K20-me2. We have hypothesized whether the compromised ability to bind to the site of DNA lesions could be attributed to posttranslational modifications of 53BP1 during the mitosis. We have shown that major mitotic kinases Cdk1 and Plk1 phosphorylate 53BP1 within its UDR domain at Thr1609 and Ser1618 respectively. Importantly these phosphorylations interfere with 53BP1 ability to bind ubiquitinated histones, to localize to sites of DNA damage and ultimately hampers DNA repair. Correspondingly, the inhibition of Plk1 increased of DNA repair capacity in mitotic cells.

While we have demonstrated that phosphomimicking mutants 53BP1-T1609D-S1618D failed to localize properly to sites of DNA damage during the interphase, the non-phosphorylatable mutants 53BP1-T1609A-S1618A did not rescue the recruitment of 53BP1 to DNA lesions during the mitosis (data not shown). This suggests the existence of yet another mechanism that prevents proper function of 53BP1 during the mitosis. In parallel to our study, Orthwein et al. showed that in addition to 53BP1, RNF8 ubiquitin ligase is phosphorylated during the mitosis by CDK1 at Thr198. The phosphorylation of Thr198 abrogated the RNF8 binding to MDC1 and thus prevented the ubiquitination of histone H2A in the vicinity of DNA lesions. Importantly, once the combination of non-phosphorylatable mutants RNF8-T198A and 53BP1-T1609A-S1618A was introduced into mitotic cells, the recruitment of 53BP1 to the damaged chromatin was restored (Orthwein et al., 2014).

Taken together, cells efficiently suppress their DNA repair mechanisms during mitosis. The active and multiple regulations of this suppression suggest that the DNA repair during mitosis is highly undesirable. Indeed, once the DNA repair was artificially restored by expression of non-phosphorylatable mutants of RNF8 (T198A) and 53BP1 (T1609A/S1618A), the mitotic cells were even further sensitized to DNA damage and exhibited genome instability. In particular, they were prone to sister telomere fusions and shown increased rates of missegregation of chromosomes, ultimately leading to micronuclei formation and aneuploidy (Orthwein et al., 2014). This suggests that mitotic telomeres are particularly prone to uncapping and subsequently to fusions as results of aberrant DNA repair. The protective protein complex, termed Shelterin, normally inhibits the DNA repair in telomeric regions during the interphase (de Lange, 2009). Among the proteins of Shelterin, particularly the protector of telomeres 1 (POT1) and telomere repeat binding factor 2 (TRF2) have been suggested to protect the telomere ends from fusions by inhibition of ATM and ATR activity (Denchi and de Lange, 2007). In contrary to interphase, it has been proposed that mitotic telomeres are present in an underprotected state due to the dissociation of TRF2. Interestingly, the TRF2 dissociation could be reversed by inhibition of Aurora B (Hayashi et al., 2012). Nonetheless, the particular details of both functional relevance and molecular mechanism of this phenomenon are not fully understood.

5.3. Gain-of-function mutations of *PPM1D*/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint.

Here we described novel gain-of-function mutations in *PPM1D* gene that encodes Wip1 phosphatase. Initially, we identified the Wip1 mutation in cancer cell lines U2OS and HTC116. Moreover, we found similar mutations in colon and breast cancer patients. The mutations were detected in peripheral blood, suggesting that they are not a mere consequence of genome instability in tumours. These mutations occur exclusively in mutation hotspot in exon 6 and give rise to a C-terminally truncated protein.

Truncated Wip1 retains intact catalytic domain and exhibit similar catalytic activity to the full-length protein. Importantly, we show that the truncated Wip1 protein has increased stability, with half-life more than 6 hours in contrast to 1-2h in full-length Wip1. As result, cells have a more of catalytically active Wip1, that efficiently shutdowns p53 dependent signalling. This explains the observation that U2OS and HCT116 cell lines, fail to efficiently arrest in G1 checkpoint, while they retain the wild-type alleles of p53. In support of this notion, we have shown that G1 checkpoint in these cell lines was restored upon Wip1 depletion.

The function of Wip1 C-terminus is currently unknown, our data suggest that the C-terminus renders the Wip1 unstable and controls its proteasomal degradation. We hypothesize that C-terminus either mediates Wip1 interaction with ubiquitin ligase and/or the lysines within the C-terminus are the substrates of poly-ubiquitination that targets Wip1 to degradation.

While the number of patients in our study was insufficient to statistically show that the identified mutations predispose to cancer development, a parallel extensive case controlled study by Ruark et al., confirms the clinical significance of Wip1 truncation mutations (Ruark et al., 2013).

Based on our data from cancer cell lines, it seems that the major contribution of Wip1 mutations to cancer predisposition is due to the defects in G1 checkpoint. In the current model, during the cancer development, the cells firstly acquire a gain-of-function mutation in pro-proliferative oncogenes, such a Myc or Ras. This leads to increased proliferation, yet also to increase in replication stress, DNA breakage and subsequent activation of DNA damage response and cell cycle checkpoint signalling. In presence of persisting DNA damage, cells trigger in a p53-dependent manner either an apoptosis or permanent cell cycle arrest, termed senescence. However, if the p53 is inactivated either by loss-of-function mutation or by gain-of-function mutation of Wip1, the cells loss the tumor-suppressive protection of checkpoint and the precancerous lesions can escape apoptosis and senescence and progress to become cancer (Bartkova et al., 2005; Di Micco et al., 2007; Gorgoulis et al., 2005; Halazonetis et al., 2008).

Similarly, to patients with amplification of *PPM1D*, the subset of patients with Wip1 truncating mutations might represent suitable candidates to pharmacological inhibition of Wip1. The pharmacological effects of Wip1 inhibitors *in vitro* were recently described by our group and others.

5.4. Inhibition of WIP1 phosphatase sensitizes breast cancer cells to genotoxic stress and to MDM2 antagonist nutlin-3

There is an increasing amount of evidence that Wip1 act as an oncoprotein. Wip1 overexpression and stabilizing mutation have been identified in human tumours. Moreover, it was shown that overall survival rate for lung adenocarcinoma and non-small cell lung cancer patients with Wip1-positive expression group was significantly lower than that of the Wip1-negative group (Satoh et al., 2011; Zhao et al., 2016). Therefore, Wip1 represent a potential therapeutic target for these tumours with increased Wip1 levels. In the presented study, we validated specificity and tested pharmacological effects of two commercially available Wip1 inhibitors GSK2830371 (Gilmartin et al., 2014) and CCT007093 (Rayter et al., 2008) on cancer cell lines.

While CCT007093 suppressed cell proliferation, this effect was independent on Wip1 as CRISPR induced *PPM1D* knockout exhibit the same decrease in proliferation rate. Moreover, we have not observed any increase in phosphorylation of well-established Wip1 targets such p53-pS15 and γ H2AX upon DNA damage. Therefore, we suggest that CCT007093 does not inhibit Wip1 activity in cell lines.

In contrast to CCT007093, GSK2830371 inhibited cell proliferation in Wip1-dependent manner. In addition, phosphorylation of γ H2AX and pS15 p53 was greatly increased upon GSK2830371 treatment. These findings thus confirm that GSK2830371 inhibits Wip1 phosphatase.

Importantly Wip1 inhibition reduces cell proliferation only in transformed cell lines that express high levels of Wip1, while it did not affect the proliferation non-transformed cells with low levels of Wip1. Moreover, the anti-proliferative effect of Wip1 inhibition was strictly dependent on p53 status as p53^{-/-} cells were unaffected by Wip1 inhibition. Again this supports the notion that p53 is functionally most relevant target of Wip1. We have observed that Wip1 depletion in transformed p53 positive cells resulted in the accumulation of these cells in G2 phase. This is in agreement with previous studies which showed that Wip1 depletion cause delay in G2/M transition (Lindqvist et al., 2009).

While the inhibition of Wip1 alone inhibited the cellular proliferation it did not induce the cell death. However, we were able to show that Wip1 inhibition potentiated the cell death induced by a DNA damaging agent doxorubicin. The synergy between boosting up the p53 response and doxorubicin treatment have been described before using Nutlin-3.

We have further shown that combined treatment with Wip1 inhibitor and Nutlin-3 potentiates the effect of doxorubicin by induction of both senescence and apoptosis. In addition, we observed that combination of Wip1 inhibitor and Nutlin-3 lead to hyperactivation of p53 pathway, even without genotoxic stress and also resulted in induction of senescence and cell death.

Taken together, our *in vitro* data suggest that the treatment with Wip1 inhibitor could be beneficial for the subset tumours with increased Wip1 levels and p53 wild-type status. While the inhibition of Wip1 alone slows down the proliferation of cancer cells, it is not sufficient to eradicate them. On the other hand, Wip1 inhibitors specifically sensitize the cancer cells to genotoxic drugs, such as doxorubicin, or to Mdm2 antagonists. Thus the Wip1 inhibitors could improve the response to these drugs and eventually reduced their effective dose, which would lessen the harmful effects of chemotherapy on healthy cells.

6. Conclusions

In conclusion, the results obtained during the work on this thesis contribute to our knowledge of how the cells negatively regulate DNA damage response. The dysregulation of DNA damage response plays a fundamental role in both cancer development and cancer treatment. Therefore, we believe that better understanding of molecular regulation of DDR will eventually lead to better diagnostics and to development of more targeted cancer treatments

The novel findings achieved during the work on this thesis can be summarized as follows:

- We described the regulation of Wip1 during the cell cycle. Wip1 protein levels increase from G1 to G2 and declines in mitosis. Decreased of Wip1 during mitosis is caused by APC-Cdc20 dependent proteasomal degradation. Moreover, Wip1 is phosphorylated at multiple residues during mitosis, which results in inhibition of its enzymatic activity. We suggest that the combination of degradation and inhibition of Wip1 in mitosis enables mitotic cells to retain early marker of DDR, such as γ H2AX, through the mitosis to subsequent G1, where they can continue with distant part of DDR and proper DNA repair. The abrogation of Wip1 activity during the mitosis thus enables cells to react adequately even to low levels of DNA damage encountered during unperturbed mitotic progression.
- In contrast to interphase, mitotic cells trigger only very early events of DDR and do not proceed to the recruitment of DNA repair factors such as 53BP1. Here we have shown, that 53BP1 is phosphorylated within its UDR domain at Thr1609 and S1681 by CDK1 and Plk1 respectively. These phosphorylations prevent 53BP1 to bind ubiquitinated histones, to localize to sites of DNA damage and ultimately hampers DNA repair. We showed that both 53BP1 and Plk1 localize during the mitosis to the kinetochores and thus we suggested that kinetochores may represent a compartment which promotes the Plk1 dependent-phosphorylation of 53BP1.
- We identified novel gain-of-function mutations of *PPM1D*. These mutations result in expression of C-terminally truncated Wip1. The truncated Wip1 retains its catalytic activity, while exhibit increased protein stability. As result, cells have more of catalytically active Wip1, that efficiently shut down the p53-dependent G1 checkpoint. These mutations were identified in cancer cell lines U2OS and HCT116 and importantly also in the peripheral blood of breast cancer patients. We propose that these newly identified mutations could predispose to cancer development.

- Using the cell CRISPR-Cas9 knock-out model we validated specificity and characterize the effects of Wip1 inhibitor GSK2830371. Inhibition of Wip1 significantly reduced the cell proliferation in transformed cell lines that express high levels of Wip1, while it did not affect the proliferation non-transformed cells with low levels of Wip1. In addition, we showed that inhibition of Wip1 by GSK2830371 sensitizes breast cancer cells with amplified *PPM1D* and wild-type p53 to chemotherapy treatment with DNA damaging drugs and to Mdm2 antagonist such as Nutlin-3.

- Our unpublished results show that Wip1 is phosphorylated upon UVC irradiation by MK2 at serine 46 *in vitro* and *in vivo*. In addition, we have demonstrated that Wip1 is also phosphorylated by p38 on multiple residues. These phosphorylations do not alter catalytic activity of Wip1 or its localization and their functional relevance remain to be elucidated. We were unable to reproduce previously reported observations that p38/MK2 pathway regulates γ H2AX levels upon UVC irradiation, that the p38-pT180 is a substrate of Wip1 in human cells and that the Wip1 regulates the removal of CPDs upon UVC irradiation. The functional relevance of interplay between Wip1 and p38/MK2 signalling upon genotoxic stress remains unclear.

7. *Curriculum vitae*

Jan Benada, M.Sc.

Date of Birth: 30. 4. 1987

Nationality: Czech Republic

Work experience and education:

10/2011 – present PhD in Molecular and Cell Biology, Genetics and Virology
(Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic);
PhD Thesis:
Molecular mechanisms of cell cycle checkpoint signaling and termination; Supervisor: Libor Macurek, Laboratory of Cancer Cell Biology (Libor Macurek), Institute of Molecular Genetics of the ASCR, v. v. i.

Key techniques and skills obtained:
high-content & high-throughput microscopy, live-cell microscopy; confocal microscopy; siRNA based screening; assay development, data analysis; project planning and management; teaching; scientific writing; presentation

10/2009 – 9/2011 Master in Biology, *cum laude*
(Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic);
Master's Thesis:
Dynamics of selected DNA damage response proteins;
Supervisor: Zdenek Hodny, Laboratory of Genome Integrity (Jiri Bartek),
Institute of Molecular Genetics of the ASCR, v. v. i.

Key techniques and skills obtained:
fluorescent microscopy; general biochemistry techniques including western blot and immunoprecipitations; general molecular biology techniques, including molecular cloning; mammalian cell culture

Courses and internships:

10/2014 – EMBO Practical Course: High-throughput microscopy for systems biology; EMBL Advanced Training Centre, Heidelberg, Germany

3/2012 – Arne Lindquist's lab, Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden – short stay focused on imaging and analysis of FRET probes

11/2011 – Advanced techniques in fluorescence microscopy; Scientific supervisor: David Stanek, Institute of Molecular Genetics of the ASCR; Prague, Czech Republic

Conferences:

'Importance of Wip1 posttranslational modifications in regulation of DNA damage response', **poster**, EMBO Conference: The DNA damage response in cell physiology and disease, 5-9.10.2015, Cape Sounio, Greece

'Plk1 phosphorylates 53BP1 and inhibits DNA damage response in mitosis', **poster**, DNA repair and genome stability within chromatin environments, 4-7.6.2015, Mainz, Germany

'Plk1 phosphorylates 53BP1 and inhibits DNA damage response in mitosis', **talk**, 5th Central European Genome Stability and Dynamics Meeting, 9-10.10.2014, Brno, Czech Republic

'Plk1 phosphorylates 53BP1 and inhibits DNA damage response in mitosis', **poster**, PTMs in Cell Signaling 14-18.9. 2014, Copenhagen Bioscience Conference - Novo Nordisk Foundation, Copenhagen, Denmark

'High-content microscopy screening to identify novel chemical compounds modulating DNA damage response', **poster**, 18th International Microscopy Congress, 7-12.9.2014, Prague, Czech Republic

'Downregulation of Wip1 phosphatase modulates the cellular threshold of DNA damage signaling in mitosis', **talk**, International Conference - Analytical Cytometry VII, 21.-24.9.2013 Mikulov, Czech Republic

'Phosphorylation and regulation of Wip1 in context of the cell cycle.', **poster**, PTMs in Cell Signaling 2-6.12. 2012, Copenhagen Bioscience Conference - Novo Nordisk Foundation, Copenhagen, Denmark

Teaching experience

12/2015 – Advanced Techniques in Fluorescence Microscopy; international practical course, Instructor of section focused on 'High Content Microscopy'; Scientific supervisors: Pavel Hozak, David Stanek; Coordinator: Ivan Novotny; Institute of Molecular Genetics of the ASCR; Prague, Czech Republic

2012 – present – Lecture on 'Dynamics of DNA damage response' within semestral course 'Genome integrity in carcinogenesis and aging' (MB150P62); Guarantor: Zdenek Hodny; Charles University in Prague Faculty of Science, Czech Republic

Grants, stipends and awards

2013-2015 – 'Importance of Wip1 phosphatase posttranslational modifications in regulation of DNA damage response dynamics'; Charles University Grant Agency (GAUK 836613); student research grant, principal researcher

9/2014 – The Czechoslovak Microscopy Society (CSMS) stipend to attend '18th International Microscopy Congress (IMC 2014)'

9/2013 – 'Award for Best presentation of contestant below the age of 35' for 'Downregulation of Wip1 phosphatase modulates the cellular threshold of DNA damage signaling in mitosis' at V4 International Conference - Analytical Cytometry VII, 21.-24.9.2013 Mikulov, Czech Republic

8. List of publications

Original research articles:

1. Wip1 phosphatase inhibition sensitizes breast cancer cells to genotoxic stress and to mdm2 antagonist nutlin-3.*

Pecháčková S, Burdová K, Benada J, Jeníková G, Macurek L.

Oncotarget 7 (12), 14458-14475; IF=5.01 (2015); citations (WoS 2016): 0

2. Polo-like kinase 1 inhibits DNA damage response during mitosis.*

Benada J, Burdova K, Lidak T, von Morgen P, Macurek L.

Cell Cycle 14 (2), 219-231; IF=3,95 (2015); citations (WoS 2016): 7

3. Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint.*

Kleiblova P, Shaltiel IA, Benada J, Ševčík J, Pecháčková S, Pohlreich P, Voest EE, Dundr P, Bartek J, Kleibl Z, Medema RH, Macurek L.

The Journal of cell biology 201 (4), 511-521; IF=9,08 (2015); citations (WoS 2016): 36

4. Downregulation of Wip1 phosphatase modulates the cellular threshold of DNA damage signaling in mitosis.*

Macurek L, Benada J, Müllers E, Halim VA, Krejčíková K, Burdová K, Pecháčková S, Hodný Z, Lindqvist A, Medema RH, Bartek J.

Cell Cycle 12 (2), 251-262; IF=3,95 (2015); citations (WoS 2016): 14

Review articles:

1. Targeting the Checkpoint to Kill Cancer Cells.

Benada J, Macurek L.

Biomolecules. 2015; 5(3):1912-1937. doi:10.3390/biom5031912. Epub 2015 Aug 18; IF= NA; citations (WoS 2016): 10

* PhD thesis is based on these publications.

9. Abstrakt

Pro udržení integrity genomu využívají buňky extenzivní signální síť nazývanou buněčná odpověď na poškození DNA (DNA damage response). DDR je schopná aktivovat kontrolní body buněčného cyklu (checkpoints), které brání dalšímu průchodu buněčným cyklem a umožňují buňce opravit poškozenou DNA. Poruchy těchto ochranných mechanismů se projevují závažnými lidskými onemocněními, především rozvojem rakoviny. Cílem této práce je přispět k porozumění dějů, jak buňky negativně regulují DDR a signalizaci kontrolních bodů buněčného cyklu. Zaměřili jsme se zejména na fosfatázu Wip1 (*PPM1D*), která je hlavním negativním regulátorem DDR a je nezbytná pro zotavení z kontrolních bodů. Nejprve jsme ukázali, že Wip1 je degradovaná během mitózy APC-Cdc20-dependentním mechanismem. Wip1 je dále v průběhu mitózy fosforylována na několika aminokyselinách, což vede k inhibici její enzymatické aktivity. Navrhujeme, že inhibice Wip1 umožňuje buňkám adekvátně reagovat i na nízkou hladinu poškození DNA, ke kterému dochází i při nenarušené mitóze. V následující publikaci jsme se zabývali tím, proč mitotické buňky spouštějí pouze časnou DDR a nepokračují k akumulaci opravných faktorů jako je 53BP1. Ukázali jsme, že 53BP1 je fosforylován kinázami CDK1 a Plk1 uvnitř motivu, který je zodpovědný za jeho vazbu na ubiquitin. Tyto fosforylace brání 53BP1 vázat se na ubiquitínované histony, dostat se do míst poškození DNA a ve výsledku brání efektivní opravě DNA. V zahrnutých nepublikovaných datech jsme ukázali, že Wip1 je po genotoxickém stresu fosforylována kinázami MK2 a p38. Funkční význam těchto fosforylací je však nutné dále objasnit. V další části práce jsme identifikovali nové aktivační (gain-of-function) mutace genu *PPM1D*, které způsobují expresi C-terminálně zkráceného proteinu Wip1. Zkrácená varianta Wip1 je katalyticky aktivní a vykazuje zvýšenou stabilitu. Ve výsledku mají buňky více katalyticky aktivní Wip1, která účinně vypíná p53-dependentní kontrolní bod v G1. Tyto mutace jsme objevili v buněčných liniích U2OS a HTC116 a rovněž v periferní krvi pacientů s rakovinou prsu a konečníku. Navrhujeme, že tyto mutace mohou predisponovat nositele k rozvoji rakoviny. Nakonec jsme *in vitro* ukázali, že inhibice Wip1 drogou GSK2830371 specificky senzitivizuje buňky rakoviny prsu s amplifikací *PPM1D* a wild-type alelou p53 k účinkům látek poškozujících DNA a k antagonistům Mdm2, jako je Nutlin-3. V souhrnu získané výsledky přispívají k porozumění toho, jak buňky negativně regulují DDR. Věříme, že lepší porozumění molekulárním mechanismům DDR přispěje k lepší diagnostice a vývoji cílených léčiv proti rakovině.

10. Úvod

10.1. Poškození DNA a kontrolní body buněčného cyklu

Poškození DNA, zejména pak dvouřetězcové zlomy, vážně ohrožuje integritu genomu. Poškozená DNA nemůže být bezchybně replikovaná a rovněž nemůže být správně rozdělena do dceřiných buněk. Eukaryotické buňky disponují sofistikovanými mechanismy, které jim v případě poškození DNA umožňují zastavit jejich buněčný cyklus (tzv. kontrolní body buněčného cyklu), opravit DNA a případně pak znovu pokračovat v průchodu buněčným cyklem a dělením. Pokud je poškození DNA příliš velké, mohou buňky permanentně zastavit své dělení (tzv. buněčná senescence) nebo ukončit svou existenci programovanou buněčnou smrtí (apoptóza). Selhání ochranných mechanismů udržujících integritu genomu a kontrolujících buněčné dělení se projevuje řadou vážných onemocnění, nejvýznamněji pak rozvojem rakoviny (Jackson and Bartek, 2009).

10.1.1. Signalizace kontrolního bodu v G1 fázi buněčného cyklu

V průběhu G1 fáze aktivují dvouřetězcové zlomy signální kaskádu kinázy ATM. ATM následně fosforyluje na threoninu 86 a tím aktivuje difusibilní efektorovou kinázu Chk2 (Schwarz et al., 2003). Plně aktivní Chk2 šíří signál buněčným jádrem. Chk2 fosforyluje Cdc25A, fosfatázu aktivující CDK kinázy na serinu 76. Fosforylovaná Cdc25A je potom ubikvitinována komplexem SCF/bTrCP a určena k degradaci (Mailand et al., 2000).

Udržování kontrolního bodu je zajištěno pomalejší odpovědí na úrovni transkripce a zásadně závisí na tumor-supresoru p53. ATM a Chk2 fosforylují N-terminální konec p53 a tím stabilizují p53 (Canman and Lim, 1998; Khanna et al., 1998; Shieh et al., 2000). p53 funguje jako hlavní transkripční regulátor G1 kontrolního bodu a programované buněčné smrti. Ve vztahu ke kontrolnímu bodu G1 fáze je jeho klíčovým transkripčním cílem p21. p21 váže komplexy CDK4/6-cyklin D and CDK2-cyklin E, inhibuje jejich funkci a tím brání buňce v dalším postupu buněčným cyklem. Význam p53 odráží skutečnost, že představuje nejčastěji mutovaný tumor-supresor v rakovině.

10.1.2. Signalizace kontrolního bodu v S fázi a G2/M přechodu

Přítomnost sesterské chromatidy v průběhu S fáze umožňuje buňkám nahradit relativně chybovou opravu DNA nehomologním spojováním konců (non-homologous end joining; NHEJ) přesnější opravou pomocí homologní rekombinace. Tato změna v opravě DNA je provázána výraznými změnami konců DNA a odlišnou signální odpovědí na poškození DNA. Endonukleázy Mre11 a CtIP generují na koncích DNA jednořetězcové 3' přesahy (Jazayeri et al., 2006; Sartori et al., 2007). Jednořetězcová DNA (single-stranded DNA, ssDNA) aktivuje signální kaskádu ATR/Chk1/Wee1. ATR/Chk1/Wee1 jsou rovněž aktivovány ssDNA, která je generovaná v průběhu DNA replikace, ve vyšší míře pak během replikačního stresu. Zde hrají ATR/Chk1/Wee1 klíčovou úlohu v regulaci endogenního stresu v průběhu replikace a umožňují buňce bezpečný průchod S-fázi.

ATR fosforyluje C-terminální konec Chk1. Zejména fosforylace serinů 317 a 345 jsou považovány za nezbytné pro aktivaci Chk1 (Liu et al, 2000). Chk1 fosforyluje Cdc25A na serinu 76, která je následně určena k degradaci ubiquitinací komplexem SCF/bTrCP (Busino et al.,2003; Jin et al., 2003; Kasahara et al., 2010). Chk1 rovněž fosforyluje a tím inhibuje funkci Cdc25B a Cdc25C fosfatáz. Cdc25 je fosforylována na serinu 323. Ten je následně rozpoznán 14-3-3, který blokuje katalytické místo Cdc25B a tím inhibuje její aktivitu (Forrest and Gabrielli, 2001). Cdc25C je fosforylována na serinu 216, následně rozpoznána 14-3-3 a sekvestrována do cytoplazmy, což znemožňuje její interakci s jadernými CDK (Graves et al., 2001).

Ačkoliv ke kontrolnímu bodu v G2/M rovněž přispívá signalizace p53/p21, G2/M bod na ní oproti situaci v G1 zcela nezávisí (Bunz et al., 1998). Signalizace ATM/Chk2 sice hraje úlohu v iniciaci kontrolního bodu G2/M, pro jeho udržení je však nezbytná ATR/Chk1 dráha (Painter and Young, 1980; Liu et al., 2000; Takai et al., 2000; Rainey et al., 2008; Shibata et al 2010). Kromě přímé inhibice CDK1 kinázou Wee1, checkpointová signalizace brání vstupu do mitózy rovněž inhibicí Plk1 a jejího ko-aktivátoru kinázy Aurory A a proteinu Bora (Smith, 200; Krystyniak et al., 2006; Qin et al., 2013).

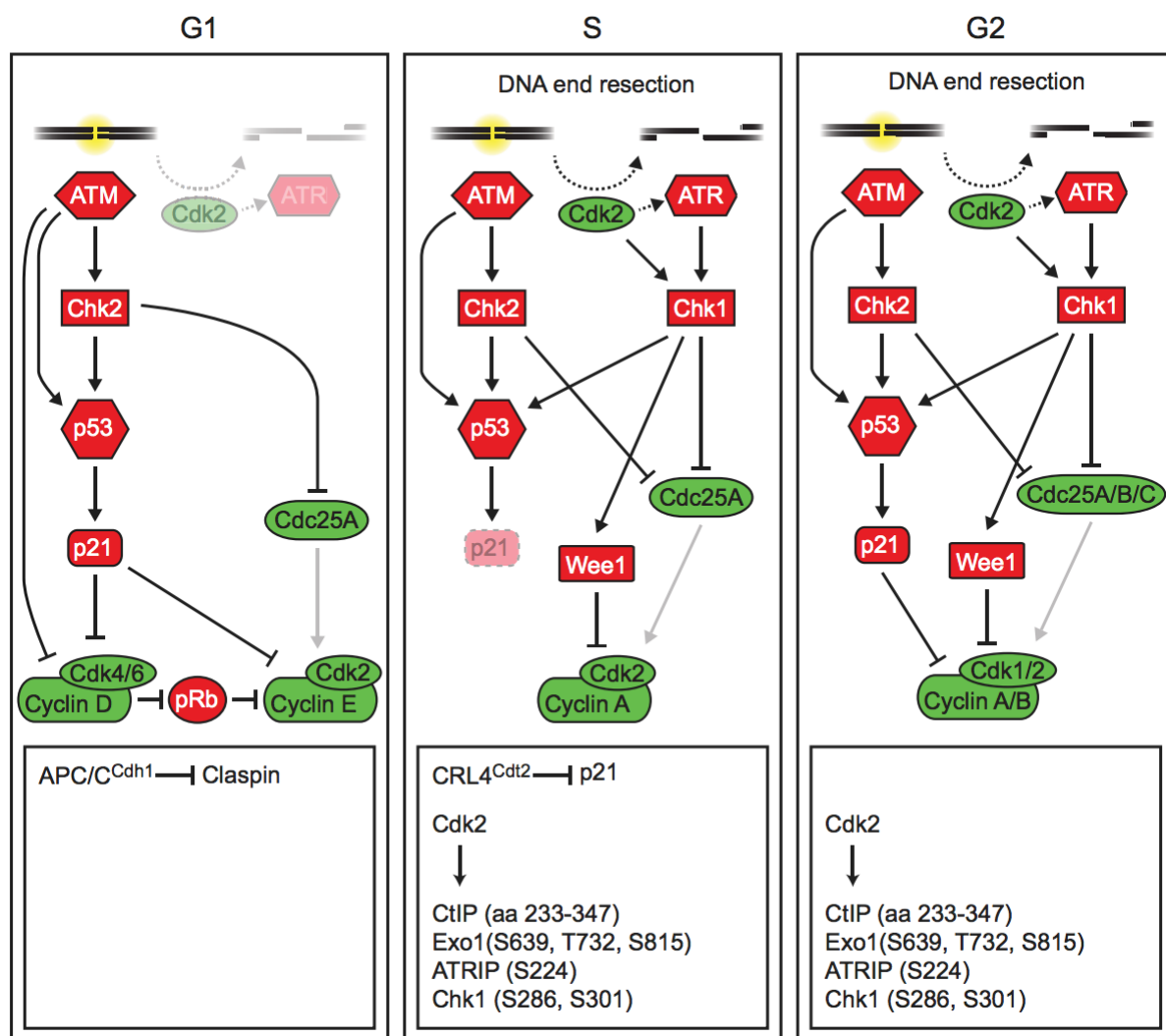


Figure 3.: Srovnání kontrolních bodů v různých fázích buněčného cyklu

Kontrolní bod v G1 závisí zásadně na ATM-Chk2-p53-p21 dráze. Oproti tomu v S fázi p21-dependentní odpověď chybí a kontrolní bod je udržován signalizací ATR-Chk1-Wee1. V G2 fázi ATM-Chk2-P53-p21 sice přispívá k ustanovení kontrolního bodu, ale hlavní roli hraje opět signalizace ATR-Chk1-Wee1 (Shaltiel et al., 2015).

10.2. Odpověď na poškození DNA je úzce propojena s mechanismy opravy DNA

Odpověď na poškození DNA je úzce propojena s mechanismy opravy DNA. Před tím než dojde k opravě DNA, je chromatin v blízkosti poškozené DNA extenzivně modifikován řadou post-translačních modifikací. Tyto modifikace následně slouží jako platformy k účinné lokalizaci proteinů zodpovědných za opravu DNA, jako jsou např. 53BP1 a Brca1. Kromě fosforylací kinázami ATM/ATR, jsou pro účinnou opravu DNA důležité zejména ubiquitinace histonů.

Protein 53BP1 se váže na modifikované histony v místech poškození DNA. Jeho UDR-motiv rozpoznává lysin 63-monoubiquitinaci na lysin 13 a 15 histonu H2B (Fradet-Turcotte et al., 2013). Dále 53BP1 rozpoznává skrze Tudor-domény dimetylované histony H4K20 (Sanders et al., 2004; Botuyan et al., 2006).

Brca1 sama o sobě nemá domény schopné rozpoznávat ubiquitinované histony. Její vazbu zprostředkovává adaptorový komplex Abraxas-RAP80 (Wang et al., 2007). 53BP1 stimuluje opravu DNA prostřednictvím NHEJ. Oproti tomu Brca1 podporuje opravu homologní rekombinací. Antagonistický vztah 53BP1 a BRCA1 určuje volbu způsobu opravy DNA. Rif1, který interaguje s 53BP1, znemožňuje vazbu BRCA1 do míst poškození DNA v G1 fázi. V S/G2 fázi BRCA1 brání interakci Rif1 s 53BP1 (Chapman et al., 2013; Di Virgilio et al., 2013; Escribano-Diaz et al., 2013; Zimmermann and de Lange, 2014; Zimmermann et al., 2013).

10.3. Ukončení kontrolních bodu buněčného cyklu

V případě, že buňka úspěšně opraví poškozenou DNA, je žádoucí, aby znovu vstoupila do buněčného cyklu a pokračovala v proliferaci. Jak je popsáno výše, signalizace kontrolních bodů závisí na post-translačních modifikacích, zejména na fosforylaci zúčastněných proteinů. Kritickým krokem v ukončení kontrolního bodu je tedy opětovné odstranění těchto modifikací.

U řady proteinových fosfatáz bylo navrženo, že hrají úlohu v ukončení kontrolních bodů a zdá se, že přinejmenším některé z nich, mohou hrát zastupitelnou úlohu (Lee et al., 2014; Shaltiel et al., 2014). Zde se zaměříme na úlohu fosfatázy Wip1.

10.3.1. Wild-type p53-induced phosphatase 1 - Wip1

Wip1 je hořčík-dependentní serin/threoninová fosfatáza patřící do rodiny fosfatáz 2C (PP2C; Fiscella et al., 1997). Protein Wip1 (605 aminokyselin) se skládá z dvou hlavních domén – N-terminální, která obsahuje katalytickou doménu PP2C (1-372) a C-terminální (376-605, Yoda et al., 2006). Uvnitř jinak evolučně konzervované katalytické domény se nachází unikátní kladně nabitý segment, nazývaný B-smyčka. B-smyčka určuje substrátovou specifitu Wip1 a rovněž je místem kam se váže alosterický inhibitor Wip1 GSK2830371 (Gilmartin et al., 2014). C-terminální doména je pro Wip1 sekvenčně unikátní a její funkce není známa.

10.3.1.1. Úloha Wip1 v ukončení kontrolních bodu

Wip1 má specifitu ke dvěma motivům - pSQ/pTQ a k pTXpY. SQ/TQ odpovídá motivu fosforylovanému kinázami ATM a ATR. Wip1 je tak schopná bránit aktivitě buněčné signalizace na

poškození DNA na mnoho úrovních této kaskády a defosforyluje prakticky všechny hlavní hráče – ATM, gH2AX, Chk1, Chk2 a v první řadě p53 (Van Maerken et al., 2009, figure 2009). Lindquist et al., ukázal, že v buňkách s depletovanou Wip1 je signalizace p53 schopná snížit hladinu cyklinu B pod hranici nutnou pro zachování minimální aktivity CDK1-cyklin B1, která je nezbytná pro zotavení z kontrolního bodu (Lindquist et al., 2009). V souhrnu Wip1 funguje jako homeostatický regulátor buněčné odpovědi na poškození DNA skrze defosforylování substrátů ATM/ATR, především pak vyvažuje p53 dependentní represi CDK1 signalizace a tím udržuje schopnost buňky zotavit se z kontrolního bodu.

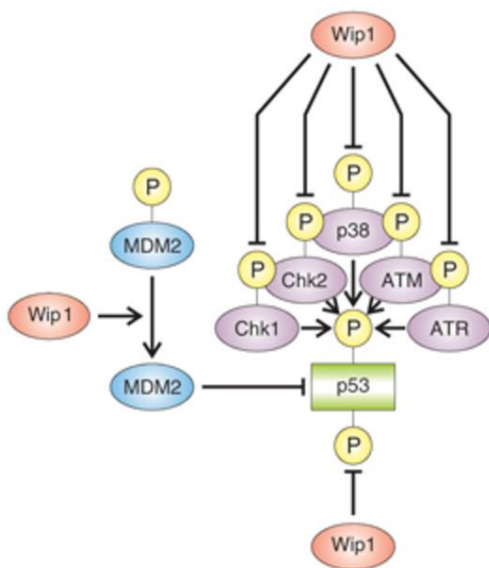


Figure 10. Inaktivace p53 představuje hlavní úlohu Wip1

Wip1 defosforyluje a tím inaktivuje hlavní aktivátory p53 - ATM, ATR, Chk1, Chk2, p38. Dále pak Wip1 odstraňuje inhibiční fosforylace z Mdm2 a tím opět přispívá k destabilizaci p53. Nakonec Wip1 defosforyluje přímo aktivační fosforylace p53. Adaptováno z modifikacemi z (Van Maerken et al., 2009).

11. Cíle práce

Cílem této práce je přispět k pochopení toho, jak buňky regulují odpověď na poškození DNA a jak regulují signalizaci kontrolních bodů buněčného cyklu. Zaměřili jsme se především na fosfatázu Wip1, která je hlavním negativním regulátorem odpovědi na poškození DNA a je nezbytná pro ukončení signalizace kontrolního bodu. Ačkoliv je úloha Wip1 v regulaci těchto procesů podpořena mnohými studiemi, vlastní regulace Wip1 zůstává z velké části neobjasněna. V průběhu této práce jsme se zajímali rovněž o regulaci odpovědi na poškození DNA v průběhu mitózy. Narůstající množství důkazu ukazuje, že tato odpověď je v mitóze organizovaná odlišně od interfáze, nicméně molekulární mechanismy této regulace zůstávají neznámé.

Konkrétní cíle práce lze shrnout následovně:

- **Charakterizovat regulaci fosfatázy Wip1 v průběhu buněčného cyklu.**
- **Přispět k objasnění negativní regulace odpovědi na poškození DNA v průběhu mitózy a zejména se zaměřit na regulační úlohu post-translačních modifikací 53BP1.**
- **Charakterizovat námi nově objevené mutace PPM1D (Wip1) na molekulární úrovni.**
- **Popsat farmakologické účinky inhibitoru Wip1 na vybraných rakovinných buněčných liniích.**
- **Určit funkční relevanci vzájemné regulace mezi Wip1 a dráhou p38/MK2 po genotoxickém stresu.**

12. Přehled metod

Molekulární klonování a standardní metody molekulární biologie

Izolace RNA, syntéza cDNA a kvantitativní RT-PCR

Standardní biochemické techniky včetně SDS-PAGE, imunoblotu a imunoprecipitací

Tkáňové kultury, transfekce plasmidů a siRNA, příprava stabilních buněčných linií

Frakcionace buněk

Imunocytohistochemie

Fluorescenční mikroskopie, live-cell mikroskopie, konfokální mikroskopie, mikroiradiace laserem, high-content a high-throuput mikroskopie s odpovídající analýzou obrazu

Průtoková cytometrie

13. Diskuze

13.1. Inhibice funkce Wip1 moduluje buněčnou signalizaci na poškození DNA v mitóze

Úloha Wip1 jako hlavního negativního regulátoru odpovědi na poškození DNA je dobře dokumentována mnohými studiemi. Nicméně to, jak je Wip1 regulována zůstává z velké části neznámé. Zde jsme se zaměřili na regulaci Wip1 v průběhu buněčného cyklu.

Ukázali jsme, že hladiny proteinu Wip1 postupně rostou z G1 do G2 fáze. Tento nárůst může odrážet fakt, že exprese Wip1 je indukována rozličnými typy buněčného stresu, včetně endogenního stresu, vznikajícího v průběhu S-fáze. Ačkoliv Wip1 není nezbytná pro vstup do mitózy, její deplece způsobuje zpoždění vstupu buněk do mitózy (Lindqvist et al., 2009). Zvýšená hladina Wip1 tak potenciálně může vyvažovat aktivitu ATR a případně ATM, které mohou být indukovány při replikaci a poškození DNA. Při vstupu do mitózy hladina Wip1 rychle klesá. Tento pokles je způsoben degradací Wip1, hladina mRNA zůstává neměnná a pokles proteinových Wip1 je možné zvrátit proteasomálním inhibitorem MG132. Ukázali jsme, že deplece Cdc20 stabilizuje Wip1. Wip1 je tedy degradována v mitóze APC-Cdc20 dependentním mechanismem. Dále jsme ukázali, že Wip1 je v průběhu mitózy extenzivně fosforylována. Jako hlavní fosforylační místo kinázy CDK1 jsme identifikovali serine 40. Vzhledem k tomu, že mutační analýza serinu 40 neodhalila žádný patrný fenotyp, rozhodli jsme se rozšířit tuto analýzu o dalších 7 aminokyselin, které byly identifikované analýzou mitotického fosfoproteomu pomocí hmotnostní spektrometrie. Fosfomimetický 7D mutant ztratil katalytickou aktivitu. Nebyli jsme schopni určit zda-li je fosforylace Wip1 nezbytná pro jeho degradaci či nikoliv. Alternativně inhibice katalytické aktivity Wip1 skrze fosforylace může kooperovat s degradací Wip1 a tím zabezpečit úplnou funkční inhibici Wip1 během mitózy.

Za účelem studia funkční relevance degradace Wip1 v průběhu mitózy jsme připravili tetracyklinem indukibilní systém, který nám umožnil indukovat vysokou hladinu Wip1 v mitóze. Po indukci katalyticky aktivní Wip1 jsme nepozorovali žádnou změnu v načasování mitotické progresu, cytokinezi ani defekty v organizaci mitotického vřetenka.

Dále jsme se zaměřili na to, jak ektopická exprese Wip1 ovlivní odpověď na poškození DNA v mitóze. Mitotické buňky na rozdíl od interfázních aktivují pouze časnou DDR, ale nepokračují k aktivaci checkpointových kináz ani k akumulaci proteinů zodpovědných za opravu DNA. Dvouřetězcové zlomy v mitóze aktivují ATM, vedou k fosforylaci H2AX a vazbě MDC1, ale pozdější fáze odpovědi jsou aktivně inhibovány (Nelson et al., 2009; Giunta et al., 2010).

Odstranění funkční Wip1 v průběhu mitózy by mohlo umožňovat přetrvání gH2AX značek na poškozené DNA do následující G1 fáze, kde může být poškozená DNA dále zpracována a opravena.

Ačkoliv kontrolní bod G2/M brání buňkám s poškozenou DNA vstoupit do mitózy, buňky s malým počtem DNA zlomů jsou toho stále schopné (Harrison and Haber et al., 2006).

Alternativně, poškození DNA může přímo vzniknout i v exogenně nenarušené mitóze. Lukas et al. ukázala, že nezprocesované intermediáty replikace, které mohou vznikat v průběhu normální replikace a ve větší míře za přítomnosti replikačního stresu, jsou v průběhu mitózy přeměněny na dvouřetězcové zlomy. Docházet k tomu může jednak rupturou těchto intermediátů způsobenou kondenzací chromatinu anebo aberantní resolucí tzv. ultra-fine chromatin bridges.

Ukázali jsme, že ektopická exprese Wip1v mitóze vede k přibližně dvojnásobnému nárůstu počtu gH2AX foci v mitóze. Tomu odpovídá obdobné zvýšení počtu 53BP1 foci v následující G1 fázi. V souhrnu navrhuje, že kombinovaná inhibice a degradace Wip1 umožňuje buňkám adekvátně odpovídat i na nízkou úroveň poškození DNA, která vzniká při nenarušené mitóze.

13.2. Polo-like kináza 1 inhibuje buněčnou odpověď na poškození DNA v průběhu mitózy.

Zde jsme se zaměřili na to, proč na rozdíl od interfáze, mitotické buňky aktivují pouze časnou část odpovědi na poškození DNA, ale nepokračují však v aktivaci opravných faktorů, jako je např. 53BP1. Protein 53BP1 se váže na modifikované histony v místech poškození DNA. Jeho UDR-motiv rozpoznává lysin 63-monoubiquitinaci na lysinu 13 a 15 histonu H2B. Dále 53BP1 rozpoznává skrze Tudor-domény dimetylované histony H4K20. Rozhodli jsme se testovat, zda-li defekt ve schopnosti 53BP1 vázat se na mitotický chromatin může být způsoben jeho mitotickými postranlačními modifikacemi. Ukázali jsme, že 53BP1 je fosforylován uvnitř své UDR domény na T1609 a S1681 kinázami CDK1 a Plk1. Tyto fosforylace zabraňují 53BP1 vázat se na ubiquitované histony, lokalizovat do míst poškození DNA a ve finále tak brání opravě DNA.

Ačkoliv fosfomimetické mutanty 53BP1-T1609D-S1618D nedokázali lokalizovat na do míst poškození v průběhu interfáze, ne-fosforylovatelné mutanty 53BP1-T1609A-S1618A nevedly k obnově vazby 53BP1 na mitotický chromatin. Paralelně k naší studii, Orthwein et al., ukázal, že krom 53BP1 i RNF8 je během mitózy fosforylován CDK1 a to na Thr198. Tato fosforylace brání vazbě RNF8 na MDC1 a tudíž i následné ubiquitinaci histonů H2A v blízkosti poškozené DNA. Při kombinaci obou ne-fosforylovatelných mutant RNF8-T198A a 53BP1-T1609A-S1618A došlo k obnovení vazby 53BP1 na chromatin i v průběhu mitózy.

Ve souhrnu buňky efektivně inhibují své opravné mechanismy v průběhu mitózy. Tato aktivní a mnohoúrovňová inhibice naznačuje, že oprava DNA v průběhu mitózy je pro ně vysoce nežádoucí. Skutečně, pokud byla oprava DNA obnovena vnesením ne-fosforylovatelných mutant RNF8-T198A a

53BP1-T1609A-S1618A byly mitotické buňky ještě více senzitivizovány k poškození DNA a vykazovaly vysokou nestabilitu genomu. Především byly náchylné k fúzím sesterských telomer, zvýšené míře mis-segregací chromosomů, formaci mikrojader a aneuploidii (Orthwein et al., 2014). Zdá se, že mitotické telomery jsou velmi náchylné ke ztrátě ochranných konců a k následné fúzi způsobené nežádoucí opravou DNA. Proteinový komplex, nazývaný Shelterin chrání za normálních okolností konce telomer v interfázi (de Lange et al., 2009). Mezi jeho součásti patří proteiny protector of telomeres 1 (POT1) a telomere repeat binding factor 2 (TRF2), které chrání konce telomer před fúzí skrz přímou inhibici ATM a ATR (Denchi et al., 2007). Narozdíl od interfáze, v průběhu mitózy jsou telomery v ne zcela chráněném stavu z důvodu disociace TRF2. Disociaci TRF2 lze patrně zvrátit inhibicí aurory B (Hayashi et al., 2012). Nicméně molekulární detaily a funkční relevance tohoto mechanismu nejsou známy.

13.3. Aktivační (Gain-of-function) mutace PPM1D/Wip1 vedou k porušení kontrolního bodu G1 fáze

Popsali jsme nové aktivační (gain-of-function) mutace v genu PPM1D, který kóduje fosfatázu Wip1. Původně jsme identifikovali tyto mutace v rakovinných liniích U2OS a HTC116. Dále jsme podobné mutace našli rovněž u pacientů s rakovinou konečnicku a prsu. Tyto mutace jsme detekovali v buňkách získaných z periferní krve, což naznačuje, že nejsou pouhým následkem genomové nestability nádorů. Tyto mutace se vyskytují výhradně v exonu 6 a dávají vzniknout C-terminálně zkrácené variantě Wip1.

Zkrácená Wip1 si zachovává neporušenou katalytickou doménu a vykazuje podobnou katalytickou aktivitu jako nezkrácená varianta. Ukázali jsme, že zkrácená varianta však vykazuje zvýšenou stabilitu. Poločas zkrácené formy je vyšší než 6 hodin v porovnání s 1-2h u nezkrácené verze. Ve výsledku tak mají buňky více katalyticky aktivní Wip1, která efektivně inhibuje kontrolní bod v G1. Toto vysvětluje pozorování, že obě linie U2OS a HCT116 postrádají efektivní kontrolní bod v G1, přestože mají zachované wild-type alely p53. V souladu s tímto, jsme ukázali, že deplece Wip1 v těchto liniích vede k obnovení funkčního kontrolního bodu v G1.

Funkce C-terminální části Wip1 není známa. Naše data naznačují, že C-konec destabilizuje Wip1 a kontroluje její proteasomální degradaci. Navrhujeme proto, že C-konec Wip1 buďto zprostředkovává interakci Wip1 s ubiquitin ligázou anebo obsahuje lysiny, které slouží jako substráty polyubiquitinace a způsobují degradaci Wip1.

Počet pacientů v naší studii nebyl dostatečný pro statisticky potvrzený důkaz, že identifikované mutace způsobují predispozici k rozvoji rakoviny. Nicméně souběžně s naší studií Ruark et al., potvrdil v extenzivní kontrolované studii klinickou signifikanci těchto mutací.

Na základě našich dat z buněčných linií se zdá, že mutace Wip1 predisponují k rozvoji rakoviny

popsaným defektem kontrolního bodu v G1. Ve stávajícím modelu rozvoje rakoviny se předpokládá, že buňky nejprve získají aktivační mutaci v pro-proliferativních onkogenech jako jsou Ras nebo Myc. To vede nejen ke zvýšené proliferaci buněk, ale rovněž ke zvýšenému replikačnímu stresu, k poškození DNA a k checkpointové signalizaci. V přítomnosti přetrvávajícího poškození DNA spouští buňka p53 dependentní odpověď – buďto apoptózu nebo permanentní zastavení buněčného cyklu, tzv. senescenci. Nicméně pokud je p53 inaktivní, např. ztrátovou mutací p53 nebo aktivační mutací Wip1, pak buňka ztrácí tumor-supresivní bariéru checkpointu a precancerózní léze mohou uniknout apoptóze a senescenci a stát se rakovinnými (Bartkova et al., 2005, 2006; Gorgoulis et al., 2005; Di Micco et al., 2006; Halazonetis et al., 2008).

Podobně jako pacienti s amplifikací PPM1D i pacienti s mutacemi PPM1D představují potenciálně vhodné kandidáty na farmakologickou inhibici Wip1. Farmakologické efekty inhibitorů Wip1 *in vitro* byly recentně popsány naší skupinou i dalšími.

13.4 Inhibice fosfatázy Wip1 senzitivuje buňky odvozené z rakoviny prsu ke genotoxickému stresu a k antagonistu MDM2 nutlinu-3

Narůstající množství důkazů ukazuje, že Wip1 funguje jako onkoprotein. Zvýšená exprese a stabilizující mutace Wip1 byly popsány v lidských nádorech. Bylo ukázáno, že zvýšená exprese Wip1 signifikantně koreluje s horší prognózou přežití pacientů s plicním adenokarcinomem a s nemalobuněčným karcinomem plic (Sato et al., 2011; Zhao et al., 2016). Wip1 tudíž představuje potenciální terapeutický cíl léčby u nádorů se zvýšenou hladinou Wip1. V této práci, jsme validovali specifitu a testovali účinky dvou komerčně dostupných inhibitorů Wip1 - GSK2830371 (Gilmartin et al., 2014) a CCT007093 (Rayter et al., 2007) na modelu rakovinných buněčných linií.

CCT007093 sice potlačoval buněčnou proliferaci, ale činil tak nezávisle na Wip1 – knock-out PPM1D buňky připravené technologií CRISPR vykazovaly stejný pokles v proliferaci jako PPM1D wild-type. Rovněž jsme u CCT007093 nepozorovali žádný nárůst ve fosforylaci zavedených substrátů Wip1 jako p53-pS15 a gH2AX. Navrhujeme, že CCT007093 neinhibuje aktivitu Wip1 v lidských buňkách.

V kontrastu k nespecifickému CCT007093, GSK2830371 inhiboval proliferaci buněk v závislosti na stavu Wip1. Stejně tak jsme pozorovali očekávaný nárůst fosforylace gH2AX a p53-pS15 po inkubaci buněk s GSK2830371. Potvrdili jsme, že GSK2830371 inhibuje fosfatázu Wip1.

Inhibice Wip1 potlačovala proliferaci pouze u transformovaných linií, které exprimují vysoké hladiny Wip1. Proliferace ne-transformované linie s normální hladinou Wip1 nebyla inhibicí Wip1 ovlivněna. Dále pak anti-proliferační efekt závisel na stavu p53, linie bez p53 (p53^{-/-}) nebyly inhibicí Wip1 ovlivněny. Toto znovu potvrzuje p53 jakožto funkčně hlavní substrát Wip1. Pozorovali jsme, že

inhibice Wip1 v transformovaných p53 pozitivních liniích vedla k akumulaci buněk v G2, což je v souladu z dříve publikovanými studiemi, které ukázaly, že deplece Wip1 způsobuje zpoždění v G2/M tranzici (Lindqvist et al., 2009).

Ačkoliv samotná inhibice Wip1 způsobovala supresi buněčné proliferace, nezpůsobovala buněčnou smrt. Nicméně jsme byli schopni ukázat, že inhibice Wip1 potencuje indukci buněčné smrti doxorubicinem - látkou poškozující DNA. Dále jsme ukázali, že kombinace inhibitoru Wip1 a Nutlinu-3, antagonisty Mdm2, dále potencuje efekt doxorubicinu v indukci senescence a buněčné smrti. Pozorovali jsme rovněž, že i samotná kombinace inhibice Wip1 a Mdm2, bez genotoxického stresu, je dostatečná k hyperaktivaci p53 dráhy a vedla k indukci senescence a buněčné smrti.

Shrnuto, naše výsledky naznačují, že použití inhibitoru Wip1 by mohlo být žádoucí u tumorů se zvýšenou hladinou Wip1 a zachovaným wild-type p53. Inhibice Wip1 snižuje proliferaci rakovinných buněk, ale není dostatečná k jejich eradikaci. Avšak inhibitory Wip1 mohou specificky senzitivovat rakovinné buňky k účinkům genotoxických drog a antagonistům Mdm2. Použití inhibitoru Wip1 tedy může zlepšit odpověď na tyto drogy a případně umožnit snížení jejich účinných dávek, což by vedlo ke snížení nežádoucích účinků chemoterapie na zdravé buňky.

14. Závěr

Výsledky získané během vypracování této práce přispívají k poznání mechanismů, jak buňky negativně regulují odpověď na poškození DNA. Deregulace těchto mechanismů hraje zásadní úlohu v rozvoji rakoviny. Věříme, že detailnější porozumění molekulárním mechanismům regulujících odpověď na poškození DNA povede k lepší diagnostice a vývoji cílených protinádorových léčiv.

Nové poznatky dosažené během vypracování této práce lze shrnout následovně:

- Popsali jsme regulaci fosfatázy Wip1 v průběhu buněčného cyklu. Hladina proteinu Wip1 stoupá z G1 do G2 fáze a následně klesá v mitóze. Tento pokles je způsoben proteasomální degradací Wip1, která je regulovaná APC-Cdc20. Dále jsme ukázali, že Wip1 je v průběhu mitózy extenzivně fosforylována a to vede k inhibici její katalytické aktivity. Navrhujeme, že kombinace poklesu hladiny a inhibice Wip1 umožňuje mitotickým buňkám udržet časné markery poškození DNA, jako je např. γ H2AX, do následující G1 fáze, kde mohou buňky pokračovat v další kaskádě odpovědí a opravou DNA. Inhibice aktivity Wip1 během mitózy umožňuje buňkám adekvátně reagovat i na nízkou hladinu DNA poškození, se kterou se buňky setkávají i průběhu exogenně nenarušené mitózy.

- Na rozdíl od interfáze, mitotické buňky aktivují pouze časnou část odpovědi na poškození DNA, nepokračují však v aktivaci opravných faktorů, jako je např. 53BP1. Ukázali jsme, že 53BP1 je fosforylován uvnitř své UDR domény na T1609 a S1681 kinázami CDK1 a Plk1. Tyto fosforylace zabraňují 53BP1 vázat se na ubiquitované histony, lokalizovat do míst poškození DNA a ve finále tak brání opravě DNA. Dále jsme ukázali, že 53BP1 a Plk1 lokalizují v průběhu mitózy na kinetochorech, přičemž kinetochory mohou sloužit jako kompartmenty, které podporují fosforylaci 53BP1 kinázou Plk1.

- Identifikovali jsme nové gain-of-function mutace genu PPM1D. Tyto mutace vedou k expresi C-terminálně zkráceného proteinu Wip1. Zkrácená forma Wip1 si zachovává svou katalytickou aktivitu a vykazuje vyšší proteinovou stabilitu. Ve výsledku mají mutované buňky vyšší hladinu katalyticky aktivní Wip1, která efektivně vypíná kontrolní bod závislý na p53. Tyto mutace jsme objevili u rakovinných buněčných linií U2OS a HCT116 a rovněž u buněk v periferní krvi pacientů s rakovinou prsu. Navrhujeme, že tyto mutace mohou predisponovat k rozvoji rakoviny.

- S využitím CRISPR-Cas9 knock-out buněčného modelu jsme ověřili specifitu a charakterizovali účinky inhibitoru Wip1 GSK2830371. Inhibice Wip1 signifikantně snížila buněčnou proliferaci transformovaných linií, které exprimují vysokou hladinu Wip1. Oproti tomu neměla efekt na proliferaci netransformovaných linií s nízkou hladinou Wip1. Dále jsme ukázali, že inhibice Wip1 prostřednictvím GSK2830371 senzitivizuje buněčné linie s amplifikovaným genem PPM1D a wild-type p53 k chemoterapii látkami způsobujícími poškození DNA a antagonistům Mdm2 jako je Nutlin-3.

- Naše nepublikované výsledky ukazují, že Wip1 je fosforylována po UVC ozáření kinázou MK2 na serinu 46 *in vitro* a *in vivo*. Wip1 je rovněž fosforylována kinázou p38 na několika aminokyselinách. Tyto fosforylace nemění katalytickou aktivitu Wip1, nemění ani její lokalizaci a jejich funkční význam je třeba dále objasnit. Nepotvrdili jsme dříve publikovaná pozorování, že p38/MK2 dráha ovlivňuje hladinu gH2AX po UVC ozáření, že p38-pR180 je substrátem Wip1 v lidských buňkách a že Wip1 reguluje resoluci cyklobutanových pyrimidinových dimerů (CPDs) po UVC ozáření. Funkční význam vztahu Wip1 a signalizace p38/MK2 po genotoxickém stresu zůstává nejasný.

15. *Curriculum vitae*

Mgr. Jan Benada

Datum narození: 30. 4. 1987

Národnost: Česká republika

Pracovní zkušenosti a vzdělání:

- 10/2011 – současnost PhD studium oboru Genetika, molekulární biologie a virologie
(Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Česká republika);
PhD práce:
Molecular mechanisms of cell cycle checkpoint signaling and termination; Supervisor: Libor Macůrek, Laboratory of Cancer Cell Biology
(Libor Macůrek), Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.
- 10/2009 – 9/2011 Magistr Biologie, *cum laude*
(Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Česká republika);
Magisterská práce:
Dynamics of selected DNA damage response proteins;
Supervisor: Zdeněk Hodný, Laboratory of Genome Integrity (Jiří Bartek),
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.

Kurzy a stáže:

- 10/2014 – EMBO Practical Course: High-throughput microscopy for systems biology; EMBL
Advanced Training Centre, Heidelberg, Německo
- 3/2012 – Arne Lindquist's lab, Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institutet,
Stockholm, Švédsko – krátká stáž zaměřená na FRET analýzy
- 11/2011 – Advanced techniques in fluorescence microscopy; Scientific supervisor: David Staněk,
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.; Praha, Česká republika

Konference:

- 'Importance of Wip1 posttranslational modifications in regulation of DNA damage response', **poster**,
EMBO Conference: The DNA damage response in cell physiology and disease,
5-9.10.2015, Cape Sounio, Řecko
- 'Plk1 phosphorylates 53BP1 and inhibits DNA damage response in mitosis', **poster**, DNA repair and
genome stability within chromatin environments, 4-7.6.2015, Mainz, Německo
- 'Plk1 phosphorylates 53BP1 and inhibits DNA damage response in mitosis', **přednáška**, 5th Central
European Genome Stability and Dynamics Meeting, 9-10.10.2014, Brno, Česká republika
- 'Plk1 phosphorylates 53BP1 and inhibits DNA damage response in mitosis', **poster**, PTMs in Cell
Signaling 14-18.9. 2014, Copenhagen Bioscience Conference - Novo Nordisk Foundation, Kodaň,
Dánsko

'High-content microscopy screening to identify novel chemical compounds modulating DNA damage response', **poster**, 18th International Microscopy Congress, 7-12.9.2014, Praha, Česká republika

'Downregulation of Wip1 phosphatase modulates the cellular threshold of DNA damage signaling in mitosis', **přednáška**, International Conference - Analytical Cytometry VII, 21.-24.9.2013 Mikulov, Česká republika

'Phosphorylation and regulation of Wip1 in context of the cell cycle.', **poster**, PTMs in Cell Signaling 2-6.12. 2012, Copenhagen Bioscience Conference - Novo Nordisk Foundation, Kodaň, Dánsko

Výuka

12/2015 – Advanced Techniques in Fluorescence Microscopy; mezinárodní praktický kurz, Instruktor sekce 'High Content Microscopy'; Scientific supervisor: Pavel Hozák, David Staněk; Koordinátor: Ivan Novotný; Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.; Praha, Česká republika

2012 – 2015 – Přednáška 'Dynamics of DNA damage response' v rámci semestrálního kurzu 'Genome integrity in carcinogenesis and aging' (MB150P62); Garant Zdeněk Hodný; Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Česká republika

Granty, stipendia a ocenění

2013-2015 – 'Importance of Wip1 phosphatase posttranslational modifications in regulation of DNA damage response dynamics'; Charles University Grant Agency (GAUK 836613)

9/2014 – The Czechoslovak Microscopy Society (CSMS) stipendium pro účast na '18th International Microscopy Congress (IMC 2014)'

9/2013 – 'Award for Best presentation of contestant below the age of 35' for 'Downregulation of Wip1 phosphatase modulates the cellular threshold of DNA damage signaling in mitosis' at V4 International Conference - Analytical Cytometry VII, 21.-24.9.2013 Mikulov, Česká republika

16. Publikace

Původní vědecké práce:

1. Wip1 phosphatase inhibition sensitizes breast cancer cells to genotoxic stress and to mdm2 antagonist nutlin-3.*

Pecháčková S, Burdová K, Benada J, Jeníková G, Macurek L.

Oncotarget 7 (12), 14458-14475; IF=5.01 (2015); citace (WoS 2016): 0

2. Polo-like kinase 1 inhibits DNA damage response during mitosis.*

Benada J, Burdova K, Lidak T, von Morgen P, Macurek L.

Cell Cycle 14 (2), 219-231; IF=3,95 (2015); citace (WoS 2016): 7

3. Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint.*

Kleiblova P, Shaltiel IA, Benada J, Ševčík J, Pecháčková S, Pohlreich P, Voest EE, Dundr P, Bartek J, Kleibl Z, Medema RH, Macurek L.

The Journal of cell biology 201 (4), 511-521; IF=9,08 (2015); citace (WoS 2016): 36

4. Downregulation of Wip1 phosphatase modulates the cellular threshold of DNA damage signaling in mitosis.*

Macurek L, Benada J, Müllers E, Halim VA, Krejčíková K, Burdová K, Pecháčková S, Hodný Z, Lindqvist A, Medema RH, Bartek J.

Cell Cycle 12 (2), 251-262; IF=3,95 (2015); citace (WoS 2016): 14

Shrnující články:

1. Targeting the Checkpoint to Kill Cancer Cells.

Benada J, Macurek L.

Biomolecules. 2015; 5(3):1912-1937. doi:10.3390/biom5031912. Epub 2015 Aug 18; IF= NA;

citace (WoS 2016): 10

* Dizertační práce vychází z těchto publikací.

17. References/Reference

1. Abbas, T., and Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 9, 400-414.
2. Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldborg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., *et al.* (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434, 864-870.
3. Botuyan, M.V., Lee, J., Ward, I.M., Kim, J.E., Thompson, J.R., Chen, J., and Mer, G. (2006). Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* 127, 1361-1373.
4. Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497-1501.
5. Busino, L., Donzelli, M., Chiesa, M., Guardavaccaro, D., Ganoth, D., Dorrello, N.V., Herskho, A., Pagano, M., and Draetta, G.F. (2003). Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature* 426, 87-91.
6. Canman, C.E., and Lim, D.S. (1998). The role of ATM in DNA damage responses and cancer. *Oncogene* 17, 3301-3308.
7. Chapman, J.R., Barral, P., Vannier, J.B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., Sartori, A.A., Adams, I.R., Batista, F.D., and Boulton, S.J. (2013). RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection. *Mol Cell* 49, 858-871.
8. Chuman, Y., Kurihashi, W., Mizukami, Y., Nashimoto, T., Yagi, H., and Sakaguchi, K. (2009). PPM1D430, a novel alternative splicing variant of the human PPM1D, can dephosphorylate p53 and exhibits specific tissue expression. *J Biochem* 145, 1-12.
9. de Lange, T. (2009). How telomeres solve the end-protection problem. *Science* 326, 948-952.
10. Denchi, E.L., and de Lange, T. (2007). Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* 448, 1068-1071.
11. Di Micco, R., Fumagalli, M., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Breaking news: high-speed race ends in arrest--how oncogenes induce senescence. *Trends Cell Biol* 17, 529-536.
12. Di Virgilio, M., Callen, E., Yamane, A., Zhang, W., Jankovic, M., Gitlin, A.D., Feldhahn, N., Resch, W., Oliveira, T.Y., Chait, B.T., *et al.* (2013). Rif1 prevents resection of DNA breaks and promotes immunoglobulin class switching. *Science* 339, 711-715.
13. Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D.H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., *et al.* (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* 136, 435-446.
14. Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J.T., Tkac, J., Cook, M.A., Rosebrock, A.P., Munro, M., Canny, M.D., *et al.* (2013). A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol Cell* 49, 872-883.
15. Fiscella, M., Zhang, H., Fan, S., Sakaguchi, K., Shen, S., Mercer, W.E., Vande Woude, G.F., O'Connor, P.M., and Appella, E. (1997). Wip1, a novel human protein phosphatase that is

- induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 6048-6053.
16. Forrest, A., and Gabrielli, B. (2001). Cdc25B activity is regulated by 14-3-3. *Oncogene* *20*, 4393-4401.
 17. Fradet-Turcotte, A., Canny, M.D., Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Leung, C.C., Huang, H., Landry, M.C., Kitevski-LeBlanc, J., Noordermeer, S.M., Sicheri, F., *et al.* (2013). 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* *499*, 50-54.
 18. Gilmartin, A.G., Faitg, T.H., Richter, M., Groy, A., Seefeld, M.A., Darcy, M.G., Peng, X., Federowicz, K., Yang, J., Zhang, S.Y., *et al.* (2014). Allosteric Wip1 phosphatase inhibition through flap-subdomain interaction. *Nat Chem Biol* *10*, 181-187.
 19. Giunta, S., Belotserkovskaya, R., and Jackson, S.P. (2010). DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *J Cell Biol* *190*, 197-207.
 20. Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio, R.A., Jr., Kastriakis, N.G., Levy, B., *et al.* (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* *434*, 907-913.
 21. Graves, P.R., Lovly, C.M., Uy, G.L., and Piwnica-Worms, H. (2001). Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding. *Oncogene* *20*, 1839-1851.
 22. Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G., and Bartek, J. (2008). An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* *319*, 1352-1355.
 23. Harrison, J.C., and Haber, J.E. (2006). Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet* *40*, 209-235.
 24. Hayashi, M.T., Cesare, A.J., Fitzpatrick, J.A., Lazzerini-Denchi, E., and Karlseder, J. (2012). A telomere-dependent DNA damage checkpoint induced by prolonged mitotic arrest. *Nat Struct Mol Biol* *19*, 387-394.
 25. Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* *461*, 1071-1078.
 26. Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* *8*, 37-45.
 27. Jin, J., Shirogane, T., Xu, L., Nalepa, G., Qin, J., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (2003). SCFbeta-TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes Dev* *17*, 3062-3074.
 28. Kasahara, K., Goto, H., Enomoto, M., Tomono, Y., Kiyono, T., and Inagaki, M. (2010). 14-3-3gamma mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. *EMBO J* *29*, 2802-2812.
 29. Khanna, K.K., Keating, K.E., Kozlov, S., Scott, S., Gatei, M., Hobson, K., Taya, Y., Gabrielli, B., Chan, D., Lees-Miller, S.P., *et al.* (1998). ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet* *20*, 398-400.
 30. Krystyniak, A., Garcia-Echeverria, C., Prigent, C., and Ferrari, S. (2006). Inhibition of Aurora A in response to DNA damage. *Oncogene* *25*, 338-348.
 31. Lee, D.H., Acharya, S.S., Kwon, M., Drane, P., Guan, Y., Adelmant, G., Kalev, P., Shah, J., Pellman, D., Marto, J.A., *et al.* (2014). Dephosphorylation enables the recruitment of 53BP1 to double-strand DNA breaks. *Mol Cell* *54*, 512-525.

32. Lindqvist, A., de Bruijn, M., Macurek, L., Bras, A., Mensinga, A., Bruinsma, W., Voets, O., Kranenburg, O., and Medema, R.H. (2009). Wip1 confers G2 checkpoint recovery competence by counteracting p53-dependent transcriptional repression. *EMBO J* **28**, 3196-3206.
33. Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., *et al.* (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* **14**, 1448-1459.
34. Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Pedersen, R.S., Grofte, M., Chan, K.L., Hickson, I.D., Bartek, J., *et al.* (2011). 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat Cell Biol* **13**, 243-253.
35. Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Welcker, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* **288**, 1425-1429.
36. Nelson, G., Buhmann, M., and von Zglinicki, T. (2009). DNA damage foci in mitosis are devoid of 53BP1. *Cell Cycle* **8**, 3379-3383.
37. Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Noordermeer, S.M., Canny, M.D., Brun, C.M., Strecker, J., Escribano-Diaz, C., and Durocher, D. (2014). Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. *Science* **344**, 189-193.
38. Painter, R.B., and Young, B.R. (1980). Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7315-7317.
39. Qin, B., Gao, B., Yu, J., Yuan, J., and Lou, Z. (2013). Ataxia telangiectasia-mutated- and Rad3-related protein regulates the DNA damage-induced G2/M checkpoint through the Aurora A cofactor Bora protein. *J Biol Chem* **288**, 16139-16144.
40. Rainey, M.D., Black, E.J., Zachos, G., and Gillespie, D.A. (2008). Chk2 is required for optimal mitotic delay in response to irradiation-induced DNA damage incurred in G2 phase. *Oncogene* **27**, 896-906.
41. Rayter, S., Elliott, R., Travers, J., Rowlands, M.G., Richardson, T.B., Boxall, K., Jones, K., Linardopoulos, S., Workman, P., Aherne, W., *et al.* (2008). A chemical inhibitor of PPM1D that selectively kills cells overexpressing PPM1D. *Oncogene* **27**, 1036-1044.
42. Ruark, E., Snape, K., Humburg, P., Loveday, C., Bajrami, I., Brough, R., Rodrigues, D.N., Renwick, A., Seal, S., Ramsay, E., *et al.* (2013). Mosaic PPM1D mutations are associated with predisposition to breast and ovarian cancer. *Nature* **493**, 406-410.
43. Sanders, S.L., Portoso, M., Mata, J., Bahler, J., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. (2004). Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* **119**, 603-614.
44. Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450**, 509-514.
45. Schwarz, J.K., Lovly, C.M., and Piwnicka-Worms, H. (2003). Regulation of the Chk2 protein kinase by oligomerization-mediated cis- and trans-phosphorylation. *Mol Cancer Res* **1**, 598-609.
46. Shaltiel, I.A., Aprelia, M., Saurin, A.T., Chowdhury, D., Kops, G.J., Voest, E.E., and Medema, R.H. (2014). Distinct phosphatases antagonize the p53 response in different phases of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 7313-7318.

47. Shaltiel, I.A., Krenning, L., Bruinsma, W., and Medema, R.H. (2015). The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *J Cell Sci* *128*, 607-620.
48. Shibata, A., Barton, O., Noon, A.T., Dahm, K., Deckbar, D., Goodarzi, A.A., Lobrich, M., and Jeggo, P.A. (2010). Role of ATM and the damage response mediator proteins 53BP1 and MDC1 in the maintenance of G(2)/M checkpoint arrest. *Mol Cell Biol* *30*, 3371-3383.
49. Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* *14*, 289-300.
50. Smith, O. (2000). Nota bene. Awakening aurora. *Science* *288*, 69.
51. Takai, H., Tominaga, K., Motoyama, N., Minamishima, Y.A., Nagahama, H., Tsukiyama, T., Ikeda, K., Nakayama, K., Nakanishi, M., and Nakayama, K. (2000). Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev* *14*, 1439-1447.
52. Van Maerken, T., Ferdinande, L., Taildeman, J., Lambertz, I., Yigit, N., Vercruyse, L., Rihani, A., Michaelis, M., Cinatl, J., Jr., Cuvelier, C.A., *et al.* (2009). Antitumor activity of the selective MDM2 antagonist nutlin-3 against chemoresistant neuroblastoma with wild-type p53. *J Natl Cancer Inst* *101*, 1562-1574.
53. Wang, B., Matsuoka, S., Ballif, B.A., Zhang, D., Smogorzewska, A., Gygi, S.P., and Elledge, S.J. (2007). Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science* *316*, 1194-1198.
54. Yamaguchi, H., Durell, S.R., Chatterjee, D.K., Anderson, C.W., and Appella, E. (2007). The Wip1 phosphatase PPM1D dephosphorylates SQ/TQ motifs in checkpoint substrates phosphorylated by PI3K-like kinases. *Biochemistry* *46*, 12594-12603.
55. Yoda, A., Xu, X.Z., Onishi, N., Toyoshima, K., Fujimoto, H., Kato, N., Oishi, I., Kondo, T., and Minami, Y. (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. *J Biol Chem* *281*, 24847-24862.
56. Zimmermann, M., and de Lange, T. (2014). 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends Cell Biol* *24*, 108-117.
57. Zimmermann, M., Lottersberger, F., Buonomo, S.B., Sfeir, A., and de Lange, T. (2013). 53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5' end resection. *Science* *339*, 700-704.

