

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Tomáš Lid'ák

53BP1 a jeho role v buněčné odpovědi na dvouvláknové zlomy DNA

The role of 53BP1 in the cellular response to double-strand DNA breaks

Bakalářská práce

Školitel: MUDr. Libor Macůrek, Ph.D.

Praha 2014

Poděkování

Děkuji svému školiteli MUDr. Liboru Macůrkovi, Ph.D. za rady a trpělivé konzultace během vypracovávání této práce.

Prohlášení

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

V Praze, 13. května 2014

Tomáš Lid'ák

Abstrakt

Poškození genetické informace uložené v molekulách DNA podmiňuje řadu patologických stavů včetně nádorového bujení a stárnutí. Evolučně konzervované mechanismy opravy DNA brání nahromadění mutací a rozvoji genomové nestability. 53BP1 (tumor suppressor p53-binding protein 1) je důležitý regulátor buněčné odpovědi na dvouvláknové zlomy DNA, který se po vystavení buňky ionizujícímu záření stává součástí fokusů obklopujících vzniklé zlomy DNA. Funkce 53BP1 v buněčné odpovědi na poškození DNA byly objasněny až v nedávné době. Zatímco v drahách signalizujících vznik dvouvláknových zlomů kontrolním bodům buněčného cyklu hraje 53BP1 jen nepatrnou roli, ukázal se být nepostradatelný při určování typu opravy části těchto zlomů. Opravy DNA jsou ovlivněny 53BP1 v několika případech. Kontroluje resekci konců DNA, umožňuje opravy DNA v heterochromatinu, zvyšuje mobilitu nechráněných telomer a zprostředkovává synapse konců DNA během V(D)J rekombinace a izotypového přesmyku. 53BP1 negativně ovlivňuje opravu DNA v nádorových buňkách s poškozeným BRCA1 (breast cancer type 1 susceptibility protein), což může mít vliv na terapeutickou odpověď u některých nádorů prsu. Cílem této bakalářské práce je shrnout nové poznatky o roli 53BP1 v buněčné odpovědi na dvouvláknové zlomy DNA.

Klíčová slova: 53BP1, dvouvláknové zlomy DNA, kontrolní body buněčného cyklu, oprava DNA

Abstract

DNA damage may result in various pathological conditions and contributes to aging and development of cancer. Evolutionarily conserved DNA damage response prevents the accumulation of mutations and protects against genomic instability. Tumor suppressor p53-binding protein 1 (53BP1) is an important regulator of the cellular response to DNA double-strand breaks (DSB) and is a canonical component of ionizing radiation-induced foci which are formed at DNA DSB following radiation exposure. Recently, new insights have been gained into its functions in the DNA damage response. Apart from its subtle role in the DNA damage checkpoints signaling, 53BP1 is a well established player in the DNA DSB repair pathway choice. The outcome of DNA repair is influenced by 53BP1 in several contexts. 53BP1 controls 5' end resection at DNA ends, improves DSB repair in heterochromatin, promotes the mobility of uncapped telomeres and mediates synapsis of DNA ends during V(D)J and class switch recombination. 53BP1 contributes to repair defect in BRCA1 (breast cancer type 1 susceptibility protein)-deficient cells, which may have an impact on the treatment of some types of breast cancer. The aim of this bachelor's thesis is to summarize new findings about the role of 53BP1 in the cellular response to DNA DSB.

Key words: 53BP1, DNA double-strand breaks, DNA damage checkpoint signaling, DNA repair

Seznam zkratek

53BP1	Tumor suppressor p53-binding protein 1
AAA+	ATPases associated with diverse cellular activities
Abraxas	BRCA1-A complex subunit Abraxas
A-EJ	Alternative end-joining
AID	Activation-induced cytidine deaminase (aktivací indukovaná cytidin deamináza)
AT	Ataxia telangiectasia
ATLD	Ataxia-telangiectasia-like disorder
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
ATRIP	ATR-interacting protein
BLM	Bloom syndrome protein
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein
BRCT	BRCA1 C-terminal
Cdc25A	Cell division cycle 25A
CDK	Cyclin-dependent kinases (cyklin-dependentní kinázy)
CDK1	Cyclin-dependent kinase-1 (cyklin-dependentní kináza 1)
CK2	Casein kinase 2
Crb2	Cut5-repeat-binding 2
CtIP	CtBP-interacting protein
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
Exo1	Exonuclease 1 (exonukleáza 1)
EYA	Eyes absent
FHA	Forkhead associated
GAR	Glycin-arginin rich
HDAC	Histone deacetylases (histon deacetylázy)
HEAT	Huntington-EF3-PR65/A-TOR
HERC2	HECT domain and RCC1-like domain-containing protein 2
HR	Homologous recombination (homologní rekombinace)
CHD3	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3
Chk1	Checkpoint kinase-1
Chk2	Checkpoint kinase-2
Chromo	Chromatin organization modifier
IRIF	Ionizing radiation-induced foci
JMJD2A	Jumonji domain-containing protein 2A
KAP-1	KRAB-associated protein 1
KBD	Kinetochore binding domain
L3MBTL1	Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 1
LC8	8 kDa dynein light chain
LIG4	DNA ligase IV (DNA ligáza 4)
MBT	Malignant brain tumor
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
Mdm2	Mouse double minute 2 protein

Seznam zkratk – pokračování

MMR	Mismatch repair
MMSET	Multiple myeloma SET domain-containing protein
Mre11	Meiotic recombination 11
MRN	Mre11-Rad50-Nbs1
MUM1	Mutated melanoma-associated antigen 1
NBS	Nijmegen breakage syndrome
Nbs1	Nijmegen breakage syndrome protein 1
NHEJ	Non-homologous end joining
NUP153	Nucleoporin 153kDa
Oct-1	Octamer-binding protein 1
OD	Oligomerization domain (oligomerizační doména)
OPT	Oct-1, PTF, transcription
p53	Tumor suppressor p53
PAR	Poly(ADP-ribose)
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PIKK	Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase
Plk1	Polo-like kinase 1
PMRT1	Protein arginin methyltransferase I
PP4	Protein phosphatase 4
PTF	Pancreas transcription factor
PTIP	Pax transactivation domain-interacting protein
RAD50	DNA repair protein RAD50
RAD51	DNA repair protein RAD51
RAD9	DNA repair protein RAD9
RAG1/2	V(D)J recombination-activating protein 1/2
RAP80	BRCA1-A complex subunit RAP80
Rif1	Rap1-interacting factor 1
RNF168	RING finger protein 168
RNF8	RING finger protein 8
RPA	Replication protein A
SETD8	SET domain-containing protein 8
TIF	Telomere Dysfunction-Induced Foci
TIP60	60 kDa Tat-interactive protein
TRF1	Telomeric repeat factor 1
Ubc13	Ubiquitin-conjugating enzyme 13
UDR	Ubiquitylation-dependent recruitment
UIM	Ubiquitin interaction motif
VCP	Valosin-containing protein
γH2AX	Histon H2AX fosforylovaný na Ser 139

Poznámka: v případech, kdy k anglické zkratce existuje běžně užívaný český ekvivalent, je tento uveden v závorce. Ve zbylých případech byly ponechány původní anglické názvy, jejichž překlad do českého jazyka nepovažuji za účelný.

Obsah

Úvod.....	1
1. Buněčná odpověď na dvouvláknové zlomy DNA	2
1.1. Dvouvláknové zlomy	2
1.2. Signalizace poškození	2
1.3. Opravy dvouvláknových zlomů	4
2. 53BP1 a jeho lokalizace v průběhu buněčného cyklu.....	5
2.1. 53BP1	5
2.2. Lokalizace 53BP1 v průběhu buněčného cyklu	7
3. Směrování 53BP1 do míst poškození DNA.....	8
3.1. Fokusy	8
3.2. Asociace s chromatinem.....	11
4. Funkce 53BP1 v ustanovení kontrolního bodu buněčného cyklu.....	13
5. 53BP1 na křížovatce reparačních drah.....	14
5.1. Protichůdné aktivity 53BP1 a BRCA1	15
5.2. Patologický NHEJ v BRCA1 deficientních buňkách.....	17
6. Role 53BP1 v opravách DNA	18
6.1. Opravy v heterochromatinu.....	18
6.2. Fúze nechráněných telomer.....	19
6.3. Tvorba synapsí při přestavbách imunoglobulinových genů.....	20
6.3.1. Synapse během V(D)J rekombinaci	20
6.3.2. Synapse během izotypového přesmyku.....	21
Závěr	22
Literatura.....	23

Úvod

Buněčná odpověď na poškození DNA (angl. DNA damage response) zahrnuje propletenou síť signálních drah, které mají schopnost detekovat DNA poškození, aktivovat kontrolní body průchodu buněčným cyklem a iniciovat opravy DNA s cílem udržet integritu genomu. Do tohoto systému patří i protein 53BP1 (tumor suppressor p53-binding protein 1).

O funkci určitého genu (a potažmo jeho proteinového produktu) v organismu nám často nejlépe vypovídá jeho ztráta. Aby bylo možné si udělat představu o tom, do jakých procesů je 53BP1 zapojen, byly vytvořeny myší modely s poškozeným *TP53BP1* genem. Myši s nefunkčním 53BP1 se sice rodily živé a fertillní, ale vykazovaly celou řadu symptomů. Nápadná byla především zvýšená citlivost k účinkům ionizujícího záření (radiosenzitivita). Do dvou týdnů od ozáření všechny 53BP1-deficientní myši zemřely, zatímco většina těch s funkčním 53BP1 byla v té době ještě naživu. Další symptom byla chromozomální nestabilita. Chromozomy měly zvýšený počet DNA zlomů a mezer a často docházelo k aneuploidii. Během prvního půl roku zemřelo 17 % těchto 53BP1-deficientních myší, často v důsledku zhoubného nádoru brzlíku. Posledním pozorovaným symptomem byla imunodeficience. Brzlíky z těchto myší byly menší a obsahovaly o polovinu méně CD4 pozitivních thymocytů. Sleziny měly nedostatečný počet zralých B-lymfocytů. Imunodeficience tak byla způsobena poruchou ve vývoji T-lymfocytů a B-lymfocytů (Morales *et al.*, 2003; Ward a Minn, 2003).

Tato pozorování naznačovala, že 53BP1 hraje roli v buněčné odpovědi na poškození DNA a ve vývoji adaptivní složky imunitního systému. Dvacet let práce od jeho prvního popsání v roce 1994 (Iwabuchi *et al.*, 1994) potvrdilo jeho důležitost pro fungování buňky a našlo sjednocující prvek pro výše uvedené symptomy. Tím je vznik dvouvláknových DNA zlomů, ať už fyziologických (v případě přestaveb imunoglobulinových genů během vývoje T-lymfocytů a B-lymfocytů) nebo patologických při poškození DNA. Buňky tak potřebují 53BP1, aby se dokázaly vypořádat s dvouvláknovými DNA zlomy. 53BP1 reaguje i na jiné typy poškození DNA, než je dvouvláknový zlom, ale tato oblast jeho biologie stojí zatím na okraji vědeckého zájmu a ani v této práci se jí nebudu zabývat.

Cílem této práce je popsat 53BP1 a v kontextu buněčné odpovědi na dvouvláknové zlomy DNA ukázat, jak se 53BP1 dostává do míst poškození DNA a jakou roli v biologii těchto dvouvláknových zlomů hraje.

1. Buněčná odpověď na dvouvláknové zlomy DNA

Každá buňka našeho těla je každodenně vystavována celé řadě faktorů, které poškozují její DNA. Aby organizmy přežily a přenesly nepozměněnou genetickou informaci do dalších generací, musely se vyvinout signální dráhy, které jsou schopné detekovat poškození, informovat o něm buňku a zprostředkovat opravy. Z různých typů poškození DNA patří dvouvláknové zlomy k těm nejvíce nebezpečným, protože mohou vést k rozsáhlým chromozomálním změnám včetně translokací a delecí a tím podněcovat genomovou nestabilitu. Vrozené poruchy v jejich detekci, signalizaci nebo opravě jsou asociovány s předčasným stárnutím, neplodností, imunodeficiencemi, neurodegenerativními onemocněními a jsou hlavní hnací silou rakoviny (Jackson a Bartek, 2009).

1.1. Dvouvláknové zlomy

Přerušeni cukr-fosfátové kostry DNA v těsné blízkosti na obou vláknech dvoušroubovice se označuje jako dvouvláknový zlom. K jeho vzniku dochází nejčastěji při replikaci DNA. Pokud totiž replikační vidlička narazí na neopravený jednovláknový zlom v DNA, způsobí to její rozpad a vznik dvouvláknového zlomu. Další příčiny jsou kyslíkové radikály, ionizující záření z prostředí, chyby enzymů zapojených do metabolismu DNA a mechanický stres. Dvouvláknové zlomy DNA nevznikají vždy jen patologicky. V některých buněčných procesech, jako je rekombinace během meiózy a přeuspořádání imunoglobulinových genů během vývoje adaptivního imunitního systému, jsou naopak fyziologické a nezbytné (Pfeiffer *et al.*, 2000).

1.2. Signalizace poškození

Při buněčné odpovědi na poškození DNA se aktivují signální dráhy, které zabrání buňce v dalším postupu v buněčném cyklu, stimulují opravné mechanismy a poskytnou čas na opravu DNA. Podaří-li se buňce zastavené kontrolním bodem buněčného cyklu v reakci na poškození DNA odstranit všechny problémy, je jí umožněno pokračovat do další fáze (angl. checkpoint recovery). Pokud poškození přesáhne kapacitu opravného systému, je buňka směřována na programovanou buněčnou smrt (apoptóza) nebo zůstane nenávratně zastavena v buněčném cyklu (senescence). Zapojené signální dráhy nefungují izolovaně, ale tvoří komplexní síť (Lukas *et al.*, 2004).

Na začátku této signalizace stojí kinázy z rodiny PIKK (phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase). V buněčné odpovědi na dvouvláknové zlomy DNA mají klíčovou úlohu tři členové této rodiny: ATM (ataxia teleangiectasia mutated), DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) a ATR (ATM and Rad3-related).

Aktivace ATM a DNA-PKcs probíhá v místech dvouvláknových zlomů a vyžaduje proteiny, které mají schopnost tyto zlomy rozeznat (senzory). Pro aktivaci ATM je tak důležitá interakce se

senzorovým MRN (Mre11-Rad50-Nbs1)¹ komplexem (Difilippantonio *et al.*, 2005), zatímco pro DNA-PKcs asociace se senzorovým heterodimerem Ku70/Ku80 (DeFazio *et al.*, 2002). V S a G2 fázi buněčného cyklu mohou být dvouvláknové zlomy DNA zpracovány za vzniku dlouhých 3' jednovláknových přesahů DNA. Tento děj se označuje jako resekce. Výsledkem resekce je tedy vznik jednovláknových úseků DNA pokrytých proteinem RPA (replication protein A), které jsou důležité pro aktivaci třetího člena rodiny PIKK (Jazayeri *et al.*, 2006). Tím je ATR fungující ve stabilním komplexu se svým kofaktorem ATRIP (ATR-interacting protein). ATR signalizuje jak přítomnost zastavených replikačních vidliček, tak poškození DNA, které vedlo k tvorbě jednovláknových úseků (Zou a Elledge, 2003). V buněčné odpovědi na dvouvláknové zlomy má však z těchto tří kináz výsostné postavení ATM, která po své aktivaci fosforyluje stovky dalších proteinů (Matsuoka *et al.*, 2007). Vrozené mutace v *ATM* genu jsou podstatou syndromu AT (ataxia telangiectasia), který se projevuje mimo jiné zvýšenou radiosenzitivitou, nestabilitou genomu a náchylností k rozvoji nádorů (Savitsky *et al.*, 1995). Vrozené mutace v genech pro senzorový MRN komplex, fungující ve stejné dráze jako ATM, jsou asociovány s podobnými symptomy. Podstatou NBS (Nijmegen breakage syndrome) je mutace v *NBS1* genu (Varon *et al.*, 1998), zatímco podstatou ATLD (ataxia-telangiectasia-like disorder) mutace v genu kódujícím Mre11 (Stewart *et al.*, 1999).

Mezi substráty PIKK patří i kinázy Chk1 (checkpoint kinase-1) a Chk2 (checkpoint kinase-2). ATM fosforyluje Chk1 na Ser317 (Gatei *et al.*, 2003) a Chk2 na Thr 68 (Matsuoka *et al.*, 2000), zatímco ATR Chk1 na Ser 317 a Ser 345 (Zhao a Piwnicka-Worms, 2001). Chk1 a Chk2 jsou těmito fosforylacemi aktivovány a přenášejí signál dál. Mezi procesy, které dále regulují, patří postup buněčným cyklem, oprava DNA, změna struktury chromatinu, spuštění transkripce některých genů a apoptóza (Bartek a Lukas, 2003). Pro rychlé zastavení postupu buňky v buněčném cyklu v přítomnosti poškození DNA je klíčová fosforylace fosfatázy Cdc25A (cell division cycle 25A), a to především kinázou Chk1 (Jin *et al.*, 2008). CDK (cyclin-dependent kinases), skupina kináz regulujících buněčný cyklus, pro svou aktivaci totiž potřebuje kromě asociace s cykliny i fosfatázy z rodiny Cdc25, které na nich odstraní inhibiční fosforylace. Fosforylace Cdc25A iniciuje degradaci této fosfatázy proteazomem, což následně zastaví postup buněčným cyklem (Ferguson *et al.*, 2005; Mailand *et al.*, 2000).

Signální dráhy, které poskytují buňce dostatečný čas na opravy, se značně liší od těch, které na začátku v reakci na DNA poškození aktivovaly kontrolní bod buněčného cyklu. V jejich centru je tumor supresor p53. Jde o transkripční faktor, který monitoruje celou řadu stresových signálů a odpovídá na ně především aktivací transkripce specifických genů. Produkty těchto genů pak regulují další postup v buněčném cyklu, opravu DNA, apoptózu nebo senescenci. p53 je vydatně posttranslačně modifikován,

¹ Mre11 (meiotic recombination 11), RAD50 (DNA repair protein RAD50), Nbs1 (Nijmegen breakage syndrome protein 1).

a to zejména ve své C-terminální regulační doméně a v N-terminální transaktivační doméně (Dai a Gu, 2010). V nestresovaných buňkách je udržována jeho aktivita na nízké úrovni E3 ubiquitin ligázou Mdm2 (mouse double minute 2 protein), která polyubiquitínuje p53 a tím ho směřuje k degradaci proteazomem (Fang *et al.*, 2000). Naopak za stresových podmínek je p53 stabilizován. Na této pozitivní regulaci se nejvýrazněji podílí acetylace (Gu a Roeder, 1997) a fosforylace výše představenými kinázami ATM (Canman *et al.*, 1998), ATR (Tibbetts *et al.*, 1999), DNA-PKcs (Shieh *et al.*, 1997), Chk1 a Chk2 (Shieh *et al.*, 2000). Výsledkem tohoto procesu je snížená afinita p53 pro negativní regulátor Mdm2 a umožnění transkripce jeho cílových genů. V kontextu kontrolních bodů buněčného cyklu je nejdůležitější cílový gen, který kóduje p21, inhibitor CDK (Dulić *et al.*, 1994).

1.3. Opravy dvouvláknových zlomů

Mezi nejvýznamnější mechanismy opravy dvouvláknových DNA zlomů patří NHEJ (non-homologous end joining) a HR (homologous recombination).

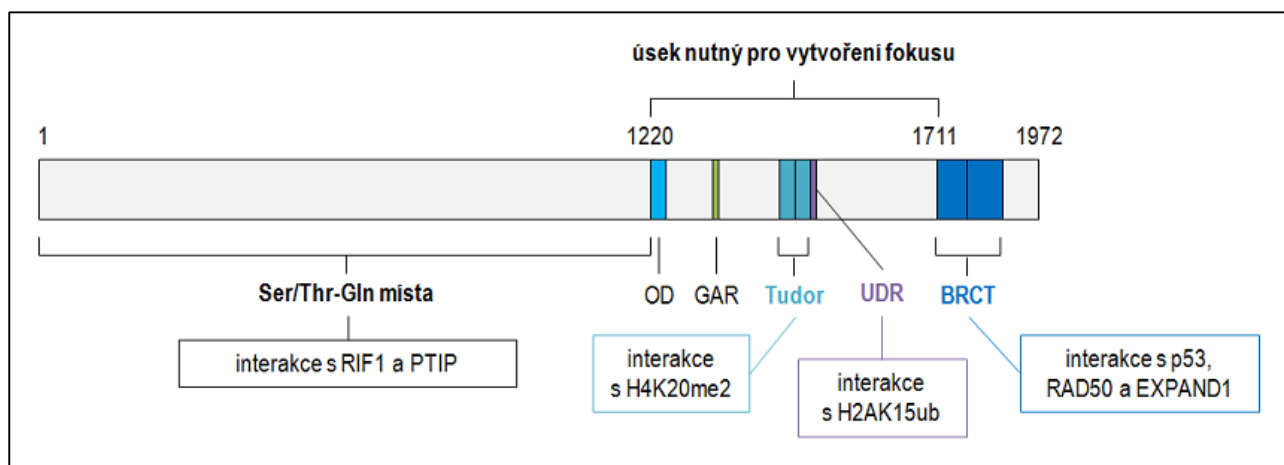
NHEJ funguje v průběhu celého buněčného cyklu a skládá se ze tří kroků – rozeznání a uchycení DNA konců, jejich úpravy a ligace. Jedná se o rychlý sled událostí. Konce dvouvláknového zlomu jsou rozeznány heterodimery Ku70/80. Na ně se okamžitě váží DNA-PKcs, které se touto interakcí aktivují. Prostřednictvím DNA-PKcs a Ku70/80 jsou konce DNA drženy v synaptickém komplexu (DeFazio *et al.*, 2002). Následně se v těchto místech shromáždí další faktory nutné pro úpravu DNA konců do podoby, která může být zligována. Tento krok, při kterém může dojít ke ztrátám nebo modifikacím nukleotidů, dělá z NHEJ způsob opravy náchylný k chybám (Wang a Lees-Miller, 2013). Na závěr LIG4 (DNA ligase IV) DNA konce spojí (Wilson *et al.*, 1997).

HR vyžaduje homologní sekvenci, typicky sesterskou chromatidu, jako templát pro opravu. Tento požadavek omezuje pole jejího působení převážně na S a G2 fázi buněčného cyklu. HR může být rovněž rozdělena do tří kroků. V prvním kroku se musí vytvořit dlouhý úsek jednovláknové DNA s navázaným proteinem RPA. Na toto vlákno se naváží mediátorové proteiny a následně se na něm začnou uspořádávat RAD51 (DNA repair protein RAD51) filamenta. V druhém kroku RAD51 filamenta zahájí hledání homologního řetězce a jeho invazi, čímž vzniká D-smyčka. Od konce invadujícího vlákna začíná opravná syntéza DNA. Třetí krok se liší v závislosti na typu HR (Heyer *et al.*, 2010). V meiotické rekombinaci vzniká dvojitá Hollidayova struktura, jejíž rozvolnění může vést k náhodné výměně chromozomálních segmentů (Baudat *et al.*, 2013). V somatických buňkách, kde je HR využívána k opravám, fungují dráhy, které si podle homologního řetězce jenom syntetizují chybějící část. V případě přítomnosti dvou konců DNA to vede ke spojení původní DNA dvoušroubovice a výsledkem je přesná oprava. Je-li přítomný jen jeden DNA konec, jako třeba po předčasném rozpadu replikační vidličky, je podle sesterské chromatidy dosyntetizována celá zbývající část DNA dvoušroubovice, což může vést ke ztrátě heterozygosity (Llorente *et al.*, 2008).

2. 53BP1 a jeho lokalizace v průběhu buněčného cyklu

2.1. 53BP1

53BP1 byl identifikován použitím kvasinkového dvouhybridového systému jako protein interagující s C-terminální regulační doménou p53 (Iwabuchi *et al.*, 1994). Přestože je schopný podporovat transkripční aktivitu p53, není jasné, do jaké míry je tento jeho příspěvek k aktivaci p53 významný. Jedná se o velký protein tvořený 1972 aminokyselinami s velikostí 217 kDa, jehož gen se u lidí nachází na dlouhém raménku 15. chromozomu (Iwabuchi *et al.*, 1998). 53BP1 nenese žádnou enzymovou aktivitu a funguje jako adaptorový multidoménový protein (Obr. 1). V následujících oddílech tak budou popsány funkce jednotlivých domén, popřípadě interakčních motivů, které 53BP1 obsahuje.



Obr. 1 | 53BP1 – schéma rozložení domén a jeho interakční partneři. Převzato z Boultona a Panierové (2014), upraveno.

Na C-konci 53BP1 se nacházejí tandemově uspořádané BRCT (BRCA1 C-terminal) domény. Rodina těchto domén byla identifikována na základě hledání sekvencí podobných tumor supresoru BRCA1 (breast cancer type 1 susceptibility protein). Tato analýza odhalila, že C-terminální část BRCA1 je homologní s C-terminální částí 53BP1 a RAD9 (DNA repair protein RAD9) proteinu z kvasinek (Koonin *et al.*, 1996). Všechny tyto tři proteiny hrají klíčovou roli v ustanovení kontrolního bodu v reakci na poškození DNA a následných opravách. Následným prohledáváním databází se našly BRCT domény u dalších desítek proteinů, většina z nich má roli v metabolismu DNA, odpovědi buňky na poškození DNA a jejích opravách (Bork *et al.*, 1997). BRCT domény mají několik funkcí. Nejvýznamnější je jejich schopnost rozeznávat a vázat fosforylované peptidové sekvence na proteinech, čímž umožňují specifické protein-protein interakce. Vzhledem k procesům, do kterých je většina proteinů nesoucí tyto domény zapojena, není překvapivé, že rozeznávané peptidové motivy jsou často fosforylované kinázami z rodiny PIKK. Nicméně u některých BRCT domén byla prokázána schopnost zprostředkovávat protein-protein interakce nezávisle na fosforylaci,

nebo dokonce vazba DNA a PAR (poly(ADP-ribose)) řetězců, jedné z prvních chromatinových značek v místech DNA poškození (Leung a Glover, 2011). Interakce mezi BRCT doménami 53BP1 a DNA-vazebnou doménou p53 byla demonstrována na dvou nezávislých krystalových strukturách. Obě BRCT domény jsou dohromady sbaleny prostřednictvím konzervovaného rozhraní a mezidoménového spojovacího úseku. Tumor supresor p53 interaguje s první BRCT doménou a spojovacím úsekem (Derbyshire *et al.*, 2002; Joo *et al.*, 2002). Do jaké míry je tato interakce fyziologicky významná *in vivo*, pokud vůbec, zůstává nezodpovězeno. Další proteiny, které interagují s 53BP1 prostřednictvím jeho BRCT domén, jsou protein EXPAND1² (Huen *et al.*, 2010) a RAD50 (Lee *et al.*, 2010). Jejich fyziologická role *in vivo* už významná je a bude popsána později.

UDR (ubiquitylation-dependent recruitment) motiv, úsek 1604–1631, je zodpovědný za specifické rozeznávání monoubiquitinovaného histonu H2a na Lys 15 (H2AK15ub). Mutace v některých konzervovaných aminokyselinových zbytcích této sekvence jsou dostačující pro zabránění akumulace 53BP1 v místech poškození DNA (Fradet-Turcotte a Canny, 2013).

Na UDR přímo navazují tandemově uspořádané Tudor domény. Ty patří do větší rodiny Tudor domén (Tudor „Royal family“), která obsahuje kromě Tudor i Chromo (chromatin organization modifier), MBT (malignant brain tumor) a PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro) domény rozeznávající methylované lysiny histonů. Tudor domény tak zprostředkovávají interakce proteinů s chromatinem, jejichž výsledkem bývá regulace transkripce nebo usnadnění oprav poškození DNA. Nicméně někteří členové této rodiny zprostředkovávají interakce s jinými proteiny (než histony) methylovanými na argininu, jež fungují v metabolismu RNA (Lu a Wang, 2013). Struktura tandemově uspořádaných Tudor domén 53BP1 byla rovněž ukázána rentgenovou krystalografií. Obě Tudor domény jsou složeny dohromady a mají celkem 10 beta-listů a jeden alfa-helix (Huyen *et al.*, 2004). Vazebná kapsa, která je součástí N-terminální Tudor domény, specificky rozeznává dimethylovaný Lys 20 na histonu H4 (H4K20me₂). O vysoké specifitě této interakce svědčí i to, že 53BP1 neváže ani strukturně velmi podobný trimethylovaný Lys 20 na histonu H4 (Botuyan *et al.*, 2006).

Argininy, které jsou součástí GAR (glycin-arginin rich) motivu, úsek 1406–1413, jsou asymetricky methylované prostřednictvím PRMT1 (protein arginin methyltransferase I), přičemž tato methylace je nezávislá na poškození DNA a mutace GAR motivu neovlivňuje akumulaci 53BP1 v místech poškození. Navíc bylo zjištěno, že se methylové GAR motivy vážou na DNA (Adams *et al.*, 2005; Boisvert *et al.*, 2005). Nebylo však nikdy zjištěno, jaký funkční význam pro 53BP1 tento methylovaný GAR motiv má.

Bylo prokázáno, že *in vivo* se 53BP1 vyskytuje jako oligomer, a to nezávisle na poškození DNA. Za tuto vlastnost je zodpovědný úsek 1231–1277, který se označuje jako OD (oligomerization

² Známý také jako MUM1 (mutated melanoma-associated antigen 1).

domain) a je nezbytný pro správnou tvorbu fokusů (Adams *et al.*, 2005; Zgheib *et al.*, 2009). Kromě tvorby fokusů je OD nepostradatelný i při tvorbě synapsí DNA konců (Lottersberger *et al.*, 2013), o nichž bude řeč v poslední kapitole. Studie, ve které se původní OD vyměňoval za jiné dobře známé úseky schopné oligomerizace, ukázala, že záměna za tetramerizační doménu je nejvíce efektivní v obnovení jeho schopnosti se hromadit v místech DNA poškození (Zgheib *et al.*, 2009). Tyto studie nicméně nevyklučují, že 53BP1 funguje jako dimer nebo se přes OD uspořádává do struktur složených z mnohem více podjednotek.

Úsek 1220–1601 překrývající se s OD, GAR motivem a Tudor doménami se dříve označovala jako KBD (kinetochore binding domain). Bylo zjištěno, že je tato oblast zodpovědná za pozorovanou akumulaci 53BP1 v oblastech kinetochorů od profáze do střední anafáze. To spolu s pozorováním hyperfosforylace 53BP1 během mitózy vedlo k hypotéze, že jeho role může být i v signalizaci na kinetochoru (Jullien *et al.*, 2002). Nicméně hypotéza nebyla dále potvrzena.

Další neobjasněná oblast biologie 53BP1 je vazba LC8 (8 kDa dynein light chain) prostřednictvím tandemu vazebných míst pro tento protein (Lo *et al.*, 2005). LC8 je součástí molekulárních motorů dyneinu a myosinu, ale kromě toho interaguje s celou řadou proteinů a slouží jako molekulární zip umožňující dimerizaci a stabilizaci svých vazebných partnerů. Mezi ně patří proteiny zapojené do intracelulárního a jaderného transportu, mitózy, apoptózy a transkripční regulace (Rapali *et al.*, 2011). O úloze interakce LC8-53BP1 tak můžeme zatím jen spekulovat.

V rozsáhlé nestrukturované N-terminální části je rozmístěna řada S/TQ (Ser/Thr-Gln) míst. Ty jsou fosforylovány kinázami z rodiny PIKK (Kim *et al.*, 1999). Některé jsou fosforylovány konstitutivně, jiné v závislosti na typu poškození prostřednictvím ATM nebo ATR kinázy (Jowsey *et al.*, 2007). Význam těchto fosforylací bude diskutován dále.

Kromě toho, že je funkce 53BP1 modulována těmito kinázami majícími klíčové postavení v buněčné odpovědi na poškození DNA, může být během mitózy fosforylován i prostřednictvím CDK1 (cyclin-dependent kinase-1) a Plk1 (polo-like kinase 1) kináz (van Vugt *et al.*, 2010).

2.2. Lokalizace 53BP1 v průběhu buněčného cyklu

53BP1 je převážně jaderný protein. V G₀/G₁ fázi buněčného cyklu je 53BP1 v jádře částečně difúzně rozprostřen a částečně je součástí větších tělísek, která budou následně popsána. V roce 1998 byly popsány OPT (Oct-1, PTF, transcription)³ domény, pojmenované po transkripčních faktorech, které jsou s nimi asociovány (Pombo *et al.*, 1998). V nedávně době bylo ukázáno, že transkripce v těchto oblastech neprobíhá a že tato tělíška, tvořená mimo jiné 53BP1⁴, mají roli v ochraně integrity obtížně replikovatelných úseků DNA (Harrigan *et al.*, 2011; Lukas *et al.*, 2011b).

³ Oct-1 (Octamer-binding protein 1), PTF (Pancreas transcription factor).

⁴ Tyto OPT domény se proto nyní často označují podle tohoto proteinu jako 53BP1 tělíška.

Důsledkem replikačního stresu není totiž v oblastech náchylným ke zlomům dokončena replikace DNA. Vstup do mitózy, který je doprovázen kondenzací chromozomů, způsobí v těchto oblastech vznik DNA zlomů. Ty jsou přeneseny do dceřiných buněk, kde se kolem nich okamžitě vytvoří velká tělíška obohacená o 53BP1. Jejich výskyt je omezen jen na G0/G1 fázi buněčného cyklu a nejpozději po vstupu do S fáze mizí. Jejich role spočívá pravděpodobně v ochraně DNA zlomů před aktivitou nukleáz, dokud nebudou k dispozici adekvátní opravné mechanismy v průběhu S fáze (Harrigan *et al.*, 2011; Lukas *et al.*, 2011b).

V S fázi má 53BP1 v jádře jemně granulární charakter, který v průběhu G2 fáze postupně vymizí a jeho rozložení v jádře se stává opět difúzní (Morales *et al.*, 2003). Při rozpadu jaderné membrány na začátku mitózy je 53BP1 uvolněn do cytosolu a následně je transportován zpět do nově tvořených jader. Transport 53BP1 do jádra závisí na jeho interakci s importinem β a NUP153 (nucleoporin 153 kDa), který je součástí jaderných pórů (Moudry *et al.*, 2012).

3. Směrování 53BP1 do míst poškození DNA

Pro 53BP1 je typické, že se po indukci DNA poškození shlukuje v jádře do menších diskretních objektů a vytváří tak tečkovaný vzor. Pro studium složení těchto objektů obklopujících dvouvláknové zlomy se používá především ionizující záření. Jsou proto nazývány IRIF (ionizing radiation-induced foci) a v této práci budou dále označovány jako fokusy. V následující části proto budou nejdříve stručně popsány některé děje a faktory, které jsou klíčové pro vznik fokusů s proteinem 53BP1. Poté se bude možné podrobněji zaměřit na asociaci 53BP1 s chromatinem v místech poškození DNA.

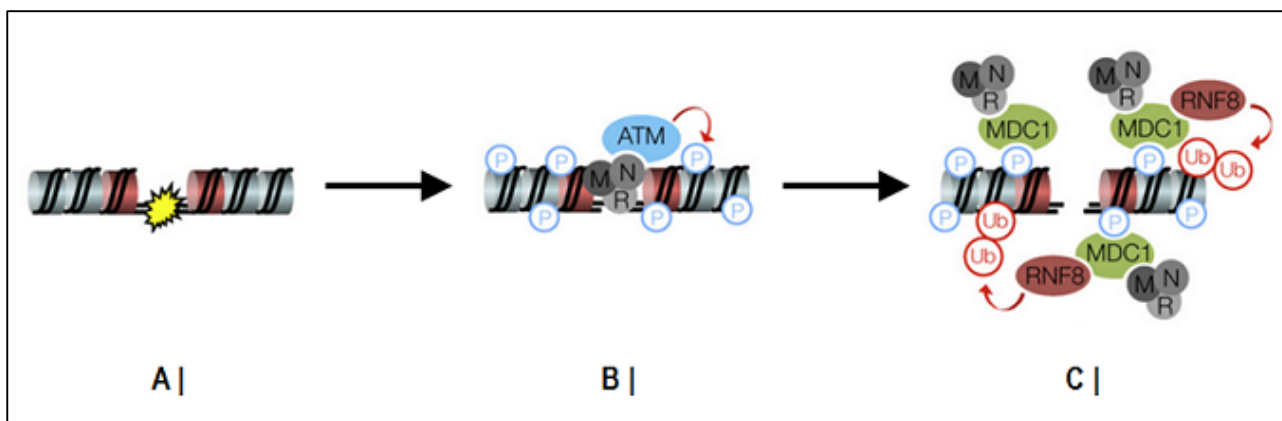
3.1. Fokusy

Vznik dvouvláknových zlomů (Obr. 2A) je okamžitě následován změnami struktury okolního chromatinu. Histony jsou označeny fosforylací, acetylací, methylací, ubiquitinací a SUMOylací. Navíc se v těchto oblastech akumuluje v rychlém a hierarchickém sledu celá řada proteinů, které hrají roli v buněčné odpovědi na poškození DNA (Lukas *et al.*, 2011a).

Dvouvláknový zlom musí být prvně rozeznán (Obr. 2B). Funkci senzoru vykonává MRN komplex. Ten funguje jako heterohexamer. Za rozeznání a vazbu DNA konců je zodpovědná globulární hlava složená ze dvou nukleáz Mre11 a dvou ATPáz Rad50 (Hopfner *et al.*, 2001). Dvě molekuly Nbs1 fungují jako flexibilní adaptory umožňující interakce s dalšími proteiny. Vazbou na Nbs1 se tak dostává do míst poškození DNA i ATM (Falck *et al.*, 2005).

ATM je aktivován v místech dvouvláknových zlomů (Obr. 2B) asociací s Nbs1 (Difilippantonio *et al.*, 2005). Mezi první substráty ATM patří histon H2AX, který je fosforylován na Ser 139 a označuje se dále jako γ H2AX (Rogakou *et al.*, 1998). Histon H2AX může být v kontextu

ionizujícím zářením indukovaných dvouvláknových zlomů redundantně fosforylován i další kinázou z rodiny PIKK, a to DNA-PK (Stiff *et al.*, 2004). Kromě fosforylace na Ser 139 musí být H2AX i defosforylován fosfatázou EYA (eyes absent) na sousedním Tyr 142. Až tato kombinace umožní MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint protein 1) vazbu na chromatin (Cook *et al.*, 2009).

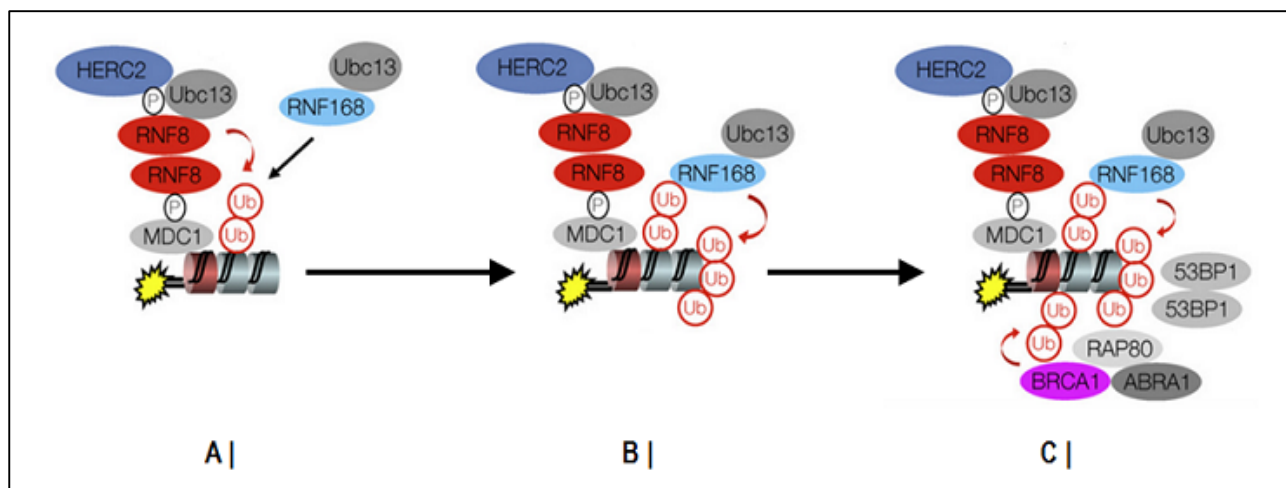


Obr. 2 | Posloupnost vzniku fokusů. A | Vznik dvouvláknového zlomu DNA. B | Jeho rozeznání sensorovým komplexem MRN a aktivace kinázy ATM vedoucí k fosforylaci okolního chromatinu. C | Nasednutí MDC1, které vede k ukotvení MRN komplexu a E3 ubiquitin ligázy RNF8 v těchto oblastech. Převzato z Jensen-Bekkera a Mailanda (2010), upraveno.

MDC1 navázaný na γ H2AX prostřednictvím tandemu svých BRCT domén umožňuje další akumulaci faktorů buněčné odpovědi na poškození DNA (Obr. 2C) v oblastech dvouvláknových zlomů (Stucki *et al.*, 2005). MDC1 je konstitutivně fosforylován CK2 (casein kinase 2) na svých opakujících se STD (Ser-Thr-Asp) sekvencích (Melander *et al.*, 2008). Ty jsou rozeznány BRCT a FHA (forkhead associated) doménami Nbs1. FHA jsou další fosfoprotein-vazebné domény typické pro proteiny buněčné odpovědi na poškození DNA. MRN komplex je tak ukotven přes fosforylovaný MDC1 na chromatin (Hari *et al.*, 2010). Vazbou na Nbs1 je ukotvena v místech poškození i kináza ATM, což umožňuje šíření fosforylace H2AX na okolní nukleozomy. Ve výsledku oblast pokrytá γ H2AX odpovídá vzdálenosti 1 Mbp DNA od původního místa poškození (Rogakou *et al.*, 1999). ATM fosforyluje také methyltransferázu MMSET (multiple myeloma SET domain-containing protein), která je pak navázána na MDC1 prostřednictvím jeho tandemové BRCT domény a zvyšuje lokálně metylaci histonů (Pei *et al.*, 2011). ATM je vyžadován i pro fosforylaci MDC1 na konzervovaných TQXP (Thr-Gln-X-Pro) místech. Na ně se váže E3 ubiquitin ligáza RNF8 (RING finger protein 8) prostřednictvím své FHA domény (Mailand *et al.*, 2007).

RNF8 asociuje po ozáření s další E3 ubiquitin ligázou, a to HERC2 (HECT domain and RCC1-like domain-containing protein 2) fosforylovanou na Thr 4827. Až komplex RNF8 a HERC2 může efektivně interagovat s E2 konjugačním enzymem Ubc13 (ubiquitine-conjugating enzyme 13) a označit histony H2A, H2B a H2AX řetězci ubiquitinů spojenými přes Lys 63 (Obr. 3A), které většinou na rozdíl od těch spojenými přes Lys 48 hrají roli v buněčné odpovědi na poškození DNA

(Bekker-Jensen *et al.*, 2010). Na H2Aub se váže E3 ubiquitin ligáza RNF168 (RING-finger ubiquitin ligase 168), která s E2 konjugačním enzymem Ubc13 rovněž polyubiquitínuje H2A a H2AX a amplifikuje tak předchozí iniciální ubiquitinaci (Obr. 3B) na úroveň potřebnou pro vazbu dalších faktorů (Doil *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2009).



Obr. 3 | 53BP1 a BRCA1 se dostávají do fokusů v závislosti na ubiquitinaci. A | Iničiální ubiquitinace je závislá na E2 konjugačním enzymu Ubc13 a komplexu E3 ubiquitin ligáz RNF8 a HERC2. B | Na iničiální řetězce ubiquitinů se váže E3 ubiquitin ligáza RNF168 s navázaným E2 konjugačním enzymem Ubc13 a ubiquitínuje další histony. C | Na tyto ubiquitinové značky nasedají 53BP1 a RAP80, který tvoří komplex s proteiny Abraxas (v obrázku označený jako ABRA1) a BRCA1. Převzato z Jensen-Bekker a Mailanda (2010), upraveno.

Na ubiquitované histony H2A a H2B se váže prostřednictvím svých dvou UIM (ubiquitin interaction motif) Rap80 (BRCA1-A complex subunit RAP80), který umožňuje přeložení těchto histonových značek do efektivní buněčné odpovědi na dvouvláknové DNA zlomy (Wu *et al.*, 2009). Rap80 totiž tvoří s několika dalšími faktory komplex, jehož základem je protein Abraxas (BRCA1-A complex subunit Abraxas). Fosforylovaný Abraxas je rozeznáván tandemovou BRCT doménou BRCA1 a umožňuje tak akumulaci BRCA1 ve focusech, která je pro správný průběh oprav DNA poškození nezbytná (Kim *et al.*, 2007; Sobhian *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). BRCA1 je součástí fokusů jen v S a G2 fázi (Scully *et al.*, 1997). Pro akumulaci 53BP1 ve focusech jsou rovněž nepostradatelné ubiquitované histony H2A a dále pak methylované histony H4 (Botuyan *et al.*, 2006; Fradet-Turcotte a Canny, 2013). 53BP1 na základě předešlé kaskády tvoří po vzniku DNA poškození fokusy, a to kdykoliv během interfáze (Anderson *et al.*, 2001; Rappold *et al.*, 2001; Schultz *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 2001).

Fyziologický význam fokusů je stále předmětem debat. Koncentrování faktorů buněčné odpovědi na poškození DNA do fokusů obklopujících místa dvouvláknových zlomů amplifikuje signální odpověď a shromáždí do těchto míst všechny potřebné enzymatické aktivity. DNA koncům může být bráněno v dalším rozpadu nebo nevhodné opravě. Jsou to tedy místa, kde se rozhoduje o

adekvátním způsobu opravy DNA. Navíc je v těchto oblastech utlumena transkripce, jejíž průběh by mohl poškození ještě zhoršit (Shanbhag *et al.*, 2010).

3.2. Asociace s chromatinem

V předchozí části byla popsána kaskáda, která umožňuje akumulaci 53BP1 v oblastech DNA zlomů. Pro jeho směrování do těchto fokusů je nezbytný úsek 1220–1711 obsahující UDR (Fradet-Turcotte a Canny, 2013), OD (Zgheib *et al.*, 2009) a tandem Tudor domén (Huyen *et al.*, 2004). Dříve již bylo rovněž uvedeno, že mu jedna z tandemu Tudor domén propůjčuje schopnost se vázat na chromatin přes H4K20me2 (Botuyan *et al.*, 2006), zatímco prostřednictvím UDR váže H2AK15ub (Fradet-Turcotte a Canny, 2013). V této části se tedy podrobněji zaměřím na jeho asociaci s chromatinem.

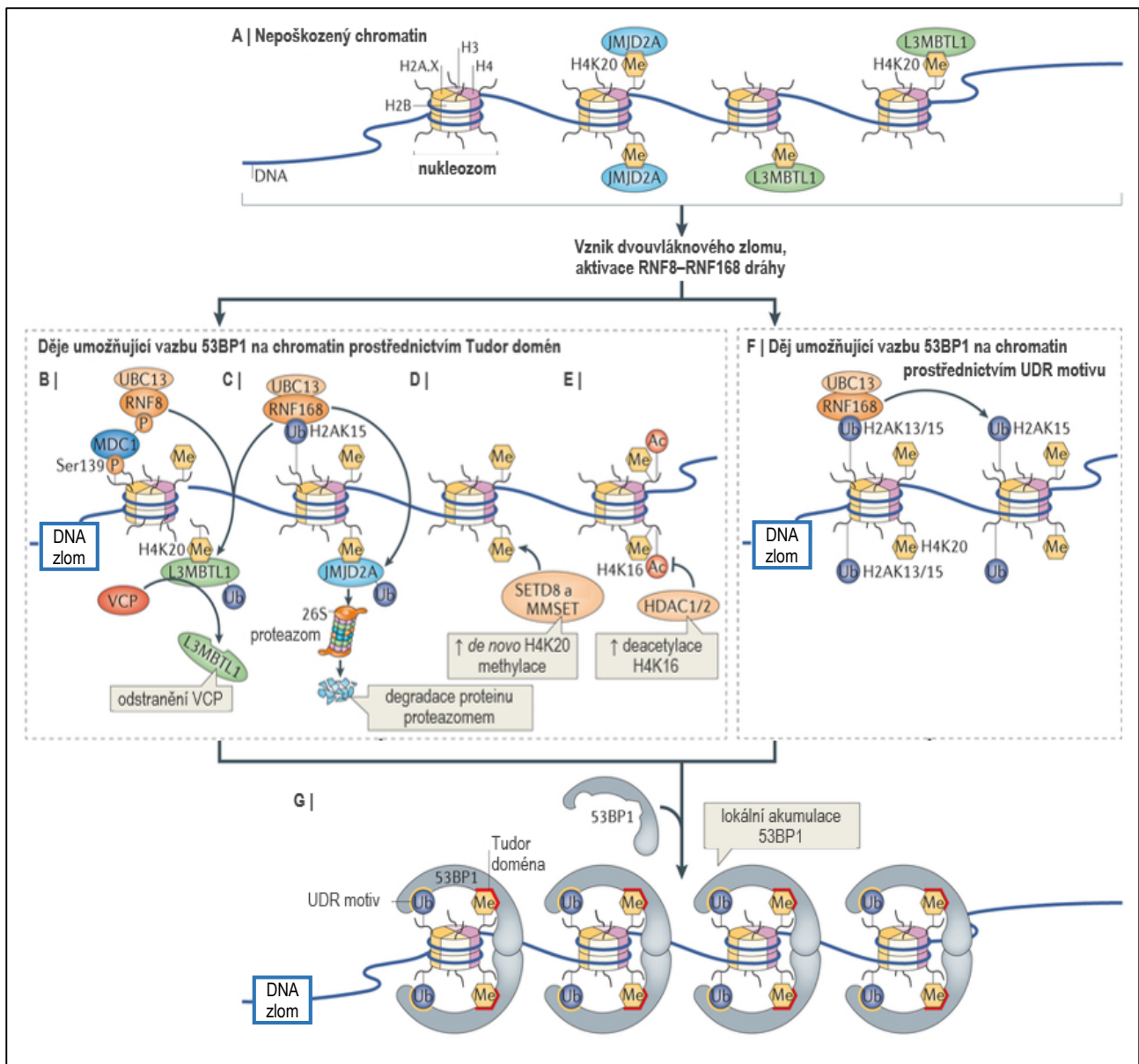
Histon H4 může být na svém lysinu 20 methylován, a to jednou, dvakrát nebo třikrát. Z těchto histonových značek je nejčastější H4K20me2, která se v nepoškozených buňkách vyskytuje na 85 % nukleozomů (Schotta *et al.*, 2008). Methylovaný H4K20 je v jádře rozeznáván celou řadou proteinů, které mají domény z rodiny Tudor (Obr. 4A). Navíc ho některé tyto proteiny váží mnohem silněji než 53BP1. Polycomb protein L3MBTL1 (lethal(3)malignant brain tumor-like protein 1) má k H4K20me2 6krát větší afinitu než 53BP1 (Li *et al.*, 2007), histonová demethyláza JMJD2A (jumonji domain-containing protein 2A) dokonce 25krát větší (Mallette *et al.*, 2012). V buňkách bez poškození DNA tak několik proteinů s různou úspěšností kompetuje o vazbu na H2K20me2. Nicméně i v nepoškozených buňkách je stále velká část 53BP1 vázána na chromatin (Bekker-Jensen *et al.*, 2005).

Dojde-li k DNA poškození, je v oblastech DNA zlomu L3MBTL1 prostřednictvím RNF8 a RNF168 polyubiquitinován (Obr. 4B). Takto označený L3MBTL1 je rozeznán ATPázou VCP (valosin-containing protein), která patří do rodiny AAA+⁵ a umožňuje odstranění L3MBTL1 z okolního chromatinu (Acs *et al.*, 2011).

RNF168 v těchto místech rovněž polyubiquitínuje JMJD2A (Obr. 4C) a tím ho směřuje k degradaci proteazomem (Mallette *et al.*, 2012). Nepřítomnost obou proteinů na chromatinu obklopujícím dvouvláknové zlomy DNA umožňuje vazbu 53BP1 na nově uvolněný H4K20me2 a akumulaci 53BP1 v těchto oblastech.

Dřívější studie ukazovaly, že pro schopnost 53BP1 se shromažďovat do fokusů je důležitá lokální *de novo* methylace histonu H4 (Obr. 4D) SETD8 (SET domain-containing protein 8) methyltransferázou (Oda *et al.*, 2010) a MMSET methyltransferázou (Pei *et al.*, 2011). Novější studie sice potvrdila důležitost SETD8 pro tvorbu fokusů, ale zároveň ukázala, že zastoupení H4K20me2 se v místech poškození výrazně nemění (Hsiao a Mizzen, 2013).

⁵ AAA+ (ATPases associated with diverse cellular activities).



Obr. 4 | Vznik dvouvláknového zlomu vyvolá buněčnou odpověď, která umožní 53BP1 asociovat s chromatinem v místě poškození. A | V nepoškozených buňkách je methylovaný histon H4K20 obsazen proteiny L3MBTL1 a JMJD2A. B | Po vzniku dvouvláknového zlomu je L3MBTL1 v závislosti na E3 ubiquitin ligázách RNF8 a RNF168 ubiquitinován a následně odstraněn z chromatinu ATPázou VCP. C | RNF168 rovněž ubiquitinuje JMJD2A a tím ho směruje k degradaci proteazomem. D | Zastoupení volně přístupného methylovaného H4K20 v místech poškození DNA dále může zvýšit i *de novo* methylace methyltransferázami SETD8 a MMSET. E | Navíc musí dojít k deacetylaci histonu H4 na Lys 16. Až kombinace dějů B–E umožní 53BP1 vázat H4K20me2 prostřednictvím jeho Tudor domén. F | RNF168 ubiquitinuje v místech poškození DNA mimo jiné i histon H2A a vytváří tak H2AK15ub, chromatinovou značku vyžadovanou pro vazbu 53BP1 na chromatin prostřednictvím jeho UDR motivu. G | Lokální nahromadění 53BP1 v oblastech obklopujících dvouvláknový zlom DNA je tedy dáno schopností 53BP1 vázat uvolněný H4K20me2 Tudor doménou a nově vytvořený H2AK15ub UDR motivem spolu s jeho schopností se oligomerizovat. Převzato z Boultona a Panierové (2014), upraveno.

Histon H4 acetylovaný na lysinu 16 funguje jako antagonistu vazby 53BP1 na H4K20me2. Během časné fáze buněčné odpovědi na poškození DNA proto musí dojít k lokální deacetylaci (Obr. 4E) histonu H4 (Hsiao a Mizzen, 2013). HDAC (histone deacetylases) podporují 53BP1 v tvorbě fokusů, zatímco acetyltransferáza TIP60 (60 kDa Tat-interactive protein) redukuje přítomnost 53BP1

na chromatinu. Důvodem je, že acetylace H4K16 vede k zamaskování kladného náboje, a tím k vyrušení elektrostatické interakce mezi histonem H4 a jednou z několika konzervovaných záporných aminokyselin C-terminální Tudor domény 53BP1. Ukázalo se tedy, že C-terminální Tudor doména je důležitá pro správné směřování 53BP1 při vazbě H4K20me2 (Tang *et al.*, 2013).

Histon H2A je v reakci na DNA poškození monoubiquitinovaný na lysinech 13–15 (Obr. 4F) katalytickou aktivitou RNF168 (Mattioli *et al.*, 2012). 53BP1 rozeznává H2A15ub prostřednictvím UDR (Fradet-Turcotte a Canny, 2013). Během mitózy, kdy přítomnost 53BP1 v oblastech DNA poškození přináší více škody než užítku, je fosforylován mitotickými kinázami na dvou zbytcích v UDR motivu. Tím mu je znemožněno vázat H2Aub a inhibice vazby je zvrácena až v G1 fázi fosfatázovým komplexem PP4 (protein phosphatase 4), který tyto zbytky defosforyluje (Lee *et al.*, 2014; Orthwein *et al.*, 2014).

Specifická akumulace 53BP1 v oblastech chromatinu obklopujících poškození DNA je tak dána unikátní kombinací několika histonových značek a jeho schopností je rozeznávat (Obr. 4G). Jakmile je nahromaděn ve fokusech, začnou se v nich koncentrovat i jeho interakční partneři. V souvislosti s chromatinem je důležitá jeho asociace s proteinem EXPAND1, který se ukázal být důležitý pro správnou opravu DNA zlomů. EXPAND1 obsahuje doménu z rodiny Tudor (PWWP), jejímž prostřednictvím je navázán na chromatin i v neporušených buňkách. S proteinem 53BP1 interaguje prostřednictvím jeho BRCT domény a v závislosti na něm se hromadí ve fokusech a způsobuje rozvolnění chromatinu (Huen *et al.*, 2010). 53BP1 může prostřednictvím svého vazebného partnera EXPAND1 způsobit relaxaci chromatinu v oblastech obklopujících DNA zlomy. Tím se usnadní přístup do těchto míst ostatním faktorům buněčné odpovědi na poškození DNA. Nicméně role 53BP1 v opravách DNA je mnohem pestřejší a bude popsána v následující částech.

4. Funkce 53BP1 v ustanovení kontrolního bodu buněčného cyklu

C-terminální část 53BP1 je značně podobná C-terminální části proteinů s dobře ustanovenou rolí v kontrolních bodech buněčného cyklu v reakci na DNA poškození, a to RAD9 ze *Saccharomyces cerevisiae* (Weinert a Hartwell, 1988) a Crb2 (Cut5-repeat-binding 2) ze *Schizosaccharomyces pombe* (Saka *et al.*, 1997; Willson *et al.*, 1997). Tato pozorování vedla k upření pozornosti na funkci 53BP1 v ustanovení kontrolních bodů po DNA poškození. Navzdory velkému očekávání není jeho role v těchto procesech výrazná (Morales *et al.*, 2003; Ward a Minn, 2003).

53BP1 amplifikuje ATM signalizaci po DNA poškození, která by v případě malého poškození nemusela být dostatečná k zastavení buněčného cyklu. V důsledku toho by buňka s neopravenou DNA mohla vstoupit do další fáze a i jeden DNA zlom by mohl způsobit fatální problém (Shibata *et al.*, 2010). V 53BP1-deficientních buňkách je po mírném poškození pozorována redukce fosforylace substrátů ATM jako je p53, Chk2 a BRCA1. V G1 fázi nedochází k dostatečné stabilizaci p53. V S fázi tyto buňky

replikují svůj genom i s poškozenou DNA jako důsledek neschopnosti ustanovit intra-S kontrolní bod buněčného cyklu. 53BP1-deficientní buňky s neopraveným DNA poškozením mohou rovněž vstupovat do mitózy v důsledku neaktivovaného G2/M kontrolního bodu buněčného cyklu. Naopak při větší míře poškození je ATM signalizace aktivována dostatečně a buňky s DNA poškozením ustanovují všechny kontrolní body i bez 53BP1 (DiTullio *et al.*, 2002; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2002; Mochan *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2002).

Zatímco iniciace signalizace vyžaduje 53BP1 jenom v případě malého poškození, pro udržení buňky v zastaveném stavu je 53BP1 potřeba nezávisle na rozsahu původního DNA poškození (Shibata *et al.*, 2010). Pro schopnost podporovat kinázovou aktivitu ATM se ukázala být důležitá schopnost 53BP1 vázat svými BRCT doménami RAD50. RAD50 je součástí MRN komplexu, který usnadňuje aktivaci ATM. Asociace 53BP1 a MRN tak ještě dále amplifikuje původní signál o přítomnosti dvouvláknového zlomu (Lee *et al.*, 2010).

5. 53BP1 na křížovatce reparačních drah

Kinetika oprav je v G1 a G2 fázi stejná a skládá se z rychlé složky, která opraví většinu DNA dvouvláknových zlomů, a pomalé složky, která je zodpovědná za opravu zbylých 10–25 %. Rychlou složku představuje v obou fázích NHEJ. Pomalá složka oprav je závislá na ATM a endonukleáze Artemis a opravuje zlomy lokalizované hlavně do heterochromatinu. V G1 fázi je pomalou složkou rovněž NHEJ, zatímco v G2 ji představuje HR. V S fázi situaci navíc komplikují rozpady replikačních vidliček. Ty produkují jeden DNA konec, jehož opravu zajistí HR. Pro opravu dvouvláknových zlomů se dvěma konci je ale i v S fázi důležitý NHEJ (Beucher *et al.*, 2009; Deckbar *et al.*, 2007; Goodarzi *et al.*, 2008; Riballo *et al.*, 2004; Rothkamm a Krüger, 2003).

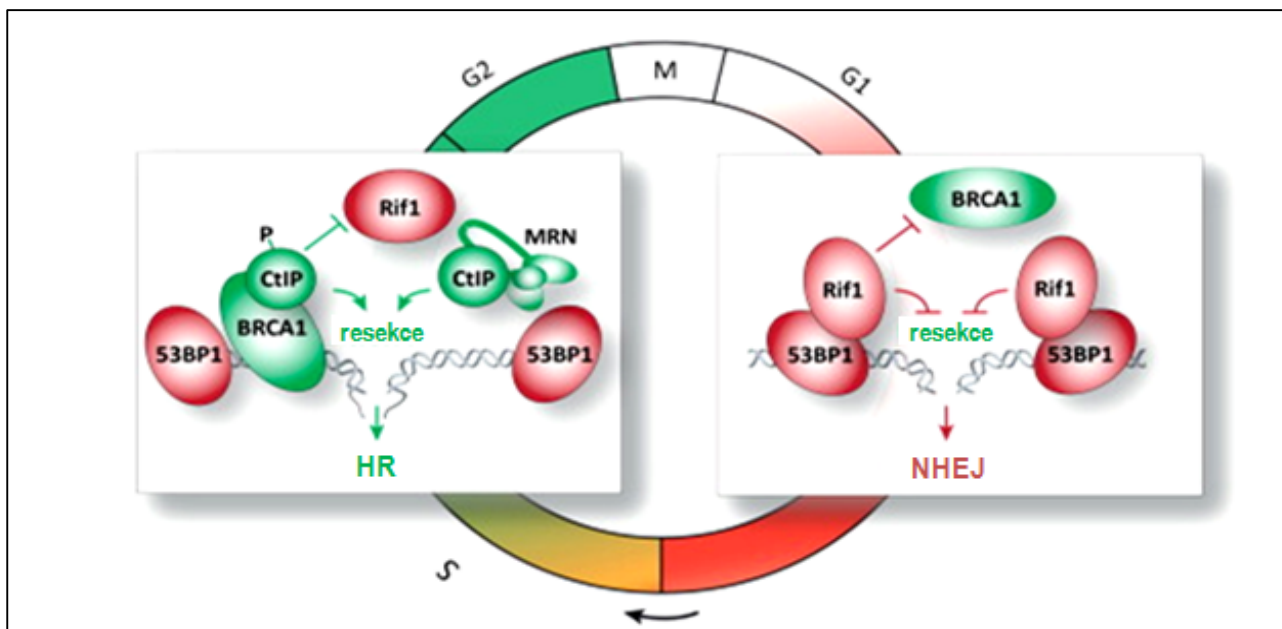
Jak již bylo uvedeno v první kapitole, vytvoření dlouhého 3' jednovláknového přesahu DNA se označuje jako resekce. Resekce DNA v 5' → 3' směru exonukleázou Exo1 (Exonuclease 1) spolu s helikázou BLM (Bloom syndrome protein) je prvním krokem HR (Nimonkar *et al.*, 2008) a zároveň krokem, který je přísně regulován. Při této regulaci se integrují informace z průběhu buněčného cyklu a buněčné odpovědi na poškození DNA. Zatímco u kvasinek jsou faktory zapojené do resekce a interakce mezi nimi relativně dobře prozkoumány, u obratlovců je poznání teprve na začátku. Resekce převažuje v S a G2 fázi, kdy je dostupná sesterská chromatida. Pro její zahájení je důležitá vazba CtIP (CtBP-interacting protein) na MRN komplex, která podporuje endonukleázovou aktivitu Mre11, a tím i resekci (Sartori *et al.*, 2007). Pro účinnou resekci jsou důležité CDK1/2 fosforylace, a to u CtIP na Thr 847 (Huertas a Jackson, 2009) a u Nbs1 na Ser 432 (Falck *et al.*, 2012). CtIP je fosforylován i na Ser 327, což umožní jeho vazbu na BRCT domény BRCA1 (Yu a Chen, 2004). V S a G2 fázi se tak na resekci může podílet i komplex BRCA1-CtIP-MRN (Chen *et al.*, 2008).

BRCA1 je tedy zapojen do prvního kroku HR, který vede ke vzniku RAD51 filament

(Schlegel *et al.*, 2006). V G1 fázi je resekce naopak silně inhibována. O roli 53BP1 v této inhibici se vědělo dlouho. Nicméně mechanismus, kterým k tomu dochází, byl poodhalen až v nedávné době nezávisle pěti laboratořemi (Escribano-Díaz *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2013; Chapman *et al.*, 2013; Di Virgilio *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2013). V následující části bude popsán model role 53BP1 a BRCA1 v směřování opravy dvouvláknového zlomu na jednu nebo druhou opravnou dráhu, včetně role Rif1 (Rap1-interacting factor 1) a PTIP (Pax transactivation domain-interacting protein) v této regulační smyčce. Ve druhé části této kapitoly bude demonstrována důležitost protichůdného působení 53BP1 a BRCA1 na příkladu BRCA1 deficientních buněk.

5.1. Protichůdné aktivity 53BP1 a BRCA1

Volba reparační dráhy, kterou bude DNA dvouvláknový zlom opraven, je mimo jiné závislá na protichůdných aktivitách proteinových komplexů 53BP1-Rif1 a BRCA1-CtIP. 53BP1-Rif1 chrání DNA konce před resekci a tím stimuluje NHEJ, zatímco BRCA1-CtIP podporuje resekci 5' konce DNA a tím HR (Obr. 5). Výsledek této regulační smyčky, která umožňuje v S a G2 fázi opravu pomocí HR, je závislý na pozici buňky v buněčném cyklu a zajišťuje se jim zvolení adekvátní dráhy (Escribano-Díaz *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2013; Chapman *et al.*, 2013; Di Virgilio *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2013).



Obr. 5 | Protichůdný vliv 53BP1 a BRCA1 na výběr dráhy zajišťující opravu DNA. V G1 fázi je součástí fokusů 53BP1 se svým interakčním partnerem Rif1. Rif1 slouží jako efektor 53BP1-zprostředkovaného vyloučení BRCA1 z fokusů a zabraňuje resekci DNA konců, čímž podporuje NHEJ. V S a G2 fázi je součástí fokusů i BRCA1 interagující s fosforylovaným CtIP. CtIP slouží jako efektor BRCA1-zprostředkovaného vyloučení Rif1 z fokusů a podporuje resekci DNA konců, čímž podporuje HR. Fosforylovaný CtIP podporuje resekci i nezávisle na BRCA1, a to prostřednictvím interakce s MRN komplexem. Převzato ze Zimmermanna a de Langeové (2014), upraveno.

Úroveň exprese BRCA1 se v průběhu buněčného cyklu nemění. I když je v G1 exprimován, není součástí fokusů. Za toto vyloučení je zodpovědný 53BP1. Potřebuje k tomu Tudor domény, které jsou nutné pro jeho schopnost se akumulovat v místech dvouvláknových DNA zlomů, a svou N-koncovou oblast, která obsahuje S/TQ místa fosforylovaná ATM. ATM zprostředkovaná fosforylace 53BP1 je nezbytná pro vazby Rif1 proteinu, který je efektoem tohoto 53BP1-zprostředkovaného vyloučení BRCA1 z fokusů v G1 fázi buněčného cyklu (Escribano-Díaz *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2013; Chapman *et al.*, 2013; Di Virgilio *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2013).

Rif1 byl původně identifikován v *Saccharomyces cerevisiae* jako protein vyžadovaný pro regulaci délky telomer (Hardy *et al.*, 1992). Později se ukázalo, že jeho lidský ortholog není asociován s nepoškozenými telomerami, ale jeho funkce je v buněčné odpovědi na poškození DNA (Silverman *et al.*, 2004). Rif1 protein interaguje s 53BP1 prostřednictvím své N-terminální domény skládající se převážně z opakujících se HEAT (Huntington-EF3-PR65/A-TOR) motivů, které umožňují proteinové interakce. Jestli se váže na 53BP1 přímo prostřednictvím své doposud neodhalené fosfoprotein-vazebné domény nebo jestli je jeho interakce s 53BP1 zprostředkována prostřednictvím dalšího proteinu, zůstává neobjasněno. K vyloučení BRCA1 je nicméně potřebná jeho C-terminální část, která mimo jiné interaguje s BLM. Nejde tedy o prostou kompetici o vazebná místa na Rif1, ale přesný mechanismus vyloučení není znám. Rif1, stejně jako 53BP1, blokuje resekci DNA konců a tvorbu RAD51 filament (Escribano-Díaz *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2013; Chapman *et al.*, 2013; Di Virgilio *et al.*, 2013). Na důležitost interakce mezi Rif1 a BLM ukázala studie, ve které se zjistilo, že v nepřítomnosti 53BP1 a Rif1 zprostředkuje BLM helikáza rozsáhlou resekci DNA konců. Naopak v jejich přítomnosti se podílí na ochraně před touto resekci (Grabarz *et al.*, 2013).

V S a G2 fázi buněčného cyklu je naopak z fokusů vyloučen Rif1 (Feng *et al.*, 2013; Chapman *et al.*, 2013), a to působením BRCA1-CtIP komplexu (Escribano-Díaz *et al.*, 2013). BRCA1 interaguje s CtIP prostřednictvím své BRCT domény. Ke vzniku tohoto komplexu a jeho následné aktivitě jsou potřebné CDK-dependentní fosforylace CtIP na Ser 327 umožňující interakci s BRCA1 (Yu a Chen, 2004) a na Thr 847 zvyšující aktivitu CtIP v resekci konců (Huertas a Jackson, 2009). K těmto fosforylacím nedochází v G1. Buněčným cyklem řízené fosforylace CtIP, které jsou podmínkou sestavení komplexu BRCA-CtIP inhibujícího NHEJ, tak mohou částečně vysvětlit schopnost reparačních drah vnímat fázi buněčného cyklu.

Překvapivou proměnnou do kontroly resekce zprostředkované 53BP1 přineslo popsání chování PTIP. Ten se v jádře podílí na regulaci genové exprese. Je totiž součástí histonových methyltransferázových komplexů, které katalyzují metylaci histonu H3 na Lys 4 a tím transkripčně aktivují takto označený chromatin (Cho *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2007). Část jaderné populace PTIP se po poškození DNA stává součástí fokusů a účastní se tak buněčné odpovědi na poškození DNA. Ve fokusech prostřednictvím svých BRCT domén váže mimo jiné fosforylovaný 53BP1 (Gong *et al.*,

2009). PTIP pro svou interakci s 53BP1 využívá prvních 8 S/TQ motivů na 53BP1, zatímco Rif1 potřebuje následných 7 S/TQ motivů. V místech poškození pak brání resekci DNA konců a podporuje tak NHEJ, avšak v jiných případech než Rif1 (Callen *et al.*, 2013), jak bude dále ukázáno.

Další protein, u kterého bylo prokázáno zapojení do této regulační smyčky, je fosforylovaný TRF1 (telomeric repeat factor 1). Tento protein je normálně asociován s telomerami, nicméně část endogenního TRF1, která je fosforylovaná CDK na Thr 371, existuje v buněčném jádře samostatně (McKerlie a Zhu, 2011). Fosforylovaná frakce TRF1 se akumuluje v místech poškození DNA v závislosti na ATM a podporuje tam resekci DNA konců a tím následně HR. K jeho směřování do míst DNA poškození je nutná BRCA1. Naopak 53BP1 a Rif1 brání jeho akumulaci v místech DNA poškození (McKerlie *et al.*, 2013).

53BP1 i BRCA1 tak slouží jako základny pro nasedání dalších proteinů. Pro objasnění mechanismu, kterým 53BP1 a BRCA1 se svými efektorovými proteiny brání/podporují resekci a tím ovlivňují výběr reparační dráhy, budou jistě užitečné další studie.

5.2. Patologický NHEJ v BRCA1 deficientních buňkách

Mutace v genu pro BRCA1 jsou známy pro svou častou asociaci s rakovinou prsu a vaječníků. Poškození obou alel tohoto genu vede u myši k smrti embryí, která je doprovázená rozsáhlými apoptotickými procesy. Tento fenotyp je zvrácen delecí p53. Nicméně právě ztráta tohoto tumor supresoru nastartuje tvorbu nádorů (Xu *et al.*, 2001). Pro BRCA1 deficienci je typická nestabilita genomu, která je důsledkem poškození oprav DNA pomocí HR a následná zvýšená aktivace ATM-Chk2-p53 signální dráhy (Cao *et al.*, 2006). To vysvětluje i další typické znaky tohoto fenotypu, kterými jsou předčasná senescence a apoptóza.

Pro léčbu nádorů s mutovaným genem pro BRCA1 se ukázalo být nadějně terapeutické cílení PARP (Poly(ADP-ribose) polymerase). PARP usnadňuje zejména opravy jednovláknových DNA zlomů (Woodhouse *et al.*, 2008). Z těch se, pokud zůstanou neopraveny, stávají v S fázi replikací dvouvláknové zlomy. A právě tyto zlomy vzniklé v důsledku rozpadu replikační vidličky vyžadují opravu prostřednictvím HR. Buňky defektní v homologní rekombinaci, mezi které patří i ty bez řádně fungujícího proteinu BRCA1, jsou proto citlivé na inhibitory PARP. Ty se zdají být slibnou terapeutickou látkou (Bryant *et al.*, 2005).

Bylo dokázáno, že za část výše uvedených projevů je zodpovědný 53BP1. Jeho delece totiž v BRCA1 deficientních myších snižuje embryonální letalitu a tumorigenezi, zvrátí předčasné stárnutí a nadměrnou apoptózu (Cao *et al.*, 2009). Snižování exprese 53BP1 v BRCA1 deficientních buňkách obnoví opravu homologní rekombinací, zvrátí jejich hypersenzitivitu k látkám poškozujícím DNA a tvorbu aberantních chromozomových formací (Bouwman *et al.*, 2010; Bunting *et al.*, 2010). Není proto překvapením, že důvodem rezistence k PARP inhibitoru při klinických studiích nádorů bývá mimo jiné i ztráta 53BP1 (Jaspers *et al.*, 2013).

Zvrácení fenotypu delecí 53BP1 v BRCA1-deficientních buňkách by tak odpovídalo výše navrženému modelu, podle něž v nepřítomnosti BRCA1 zůstává 53BP1-Rif1 komplex v místech poškození DNA i v S a G2 fázi buněčného cyklu a stimuluje tak NHEJ v případech, ve kterých by byla umožněna oprava pomocí HR. Rif1 nicméně pouze zmírňuje defekt v opravě DNA v BRCA1-deficientních buňkách, které jsou i bez Rif1 stále značně citlivé na PARP inhibitor (Escribano-Díaz *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2013; Chapman *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2013). V případě patologického NHEJ totiž 53BP1 blokuje HR prostřednictvím svého vazebného partnera PTIP. Až ztráta PTIP vede k obnovení genomové stability a HR v buňkách s nefunkčním proteinem BRCA1 (Callen *et al.*, 2013).

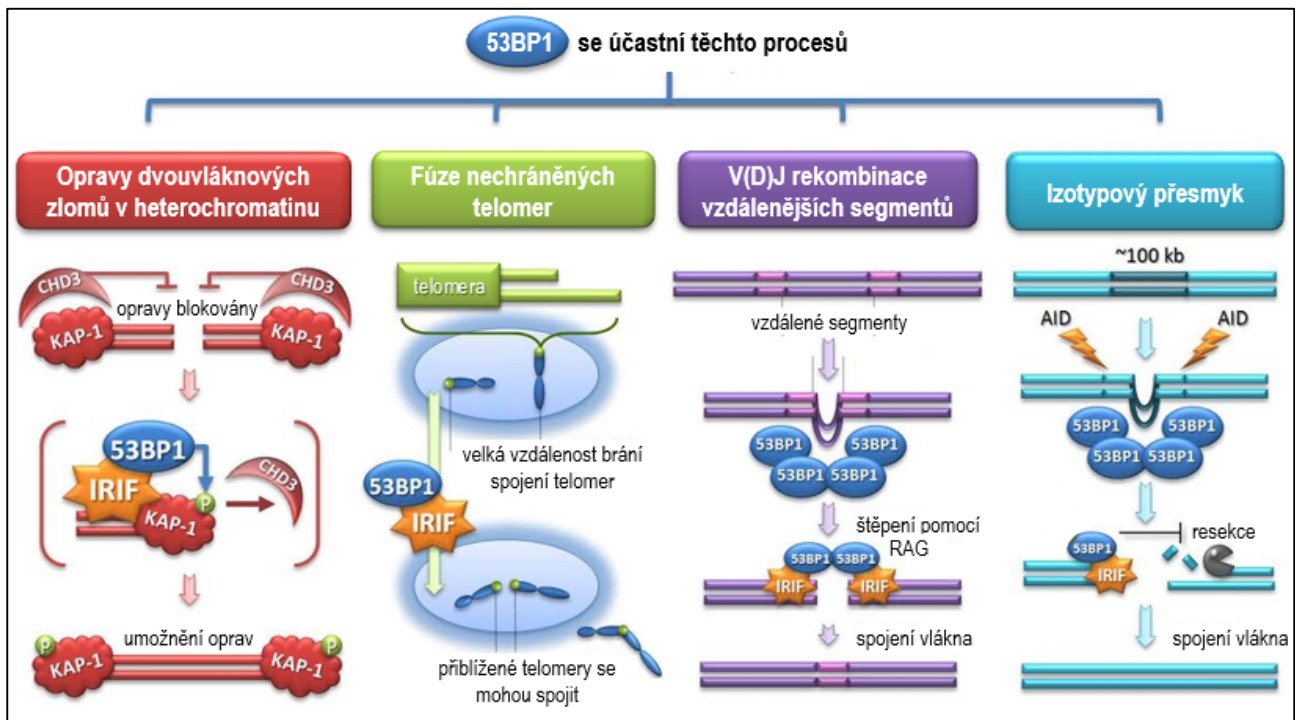
6. Role 53BP1 v opravách DNA

Jak bylo popsáno v předchozí části, 53BP1 je důležitý pozitivní regulátor NHEJ zprostředkovaných oprav, který chrání dvouvláknové zlomy DNA před resekci během G1 fáze buněčného cyklu. Role 53BP1 v opravách DNA byla studována na čtyřech modelových případech (Obr. 6). 53BP1 je důležitý pro rozvolnění struktury heterochromatinu, dojde-li k dvouvláknovému zlomu v těchto oblastech. Zvětšuje mobilitu telomer, které přišly o svůj ochranný proteinový komplex a tím umožňuje jejich fúzi. Navíc je součástí synapsí, které drží DNA konce u sebe, a umožňují jejich spojení. A to jak během V(D)J rekombinace vzdálených segmentů, tak při izotypovém přesmyku. Nyní tedy budou postupně představeny speciální případy dvouvláknových DNA zlomů, které byly využity pro studium role vlivu 53BP1 na DNA opravy.

6.1. Opravy v heterochromatinu

Heterochromatin je značně kondenzovaný a pro reparační faktory špatně přístupný. Opravy dvouvláknových zlomů v těchto oblastech představují frakci 10–25 % oprav, které probíhají pomalou kinetikou a jsou závislé na ATM (Goodarzi *et al.*, 2008; Riballo *et al.*, 2004). Jedním z klíčových proteinů, které má vliv na opravu DNA v heterochromatinu, je transkripční korepresor KAP-1 (KRAB-associated protein 1). Ten je v reakci na přítomnost dvouvláknového zlomu fosforylován na Ser 824. Fosforylovaný KAP-1 stojí na začátku dráhy, která ve výsledku způsobí v okolí DNA zlomů relaxaci heterochromatinu a umožní opravy (Ziv *et al.*, 2006). Fosforylace KAP-1 se nejdříve rychle rozšíří po celém chromatinu. Po první dočasné fázi zůstává fosforylován jen KAP-1 v okolí DNA zlomu, a to po dobu potřebnou na opravu. Přetrvávající fosforylace KAP-1 je umožněna proteinem 53BP1, který je zodpovědný za udržení vysoké koncentrace ATM ve fokusech (Noon *et al.*, 2010). 53BP1 váže svými BRCT doménami RAD50 podjednotku MRN komplexu. A protože MRN váže ATM, vede tato interakce k amplifikaci kinázové aktivity ATM (Lee *et al.*, 2010). Fosforylace KAP-1 způsobí rozrušení jeho vazby s chromatinovým remodelačním enzymem CHD3 (chromodomain-

helicase-DNA-binding protein 3), který normálně přispívá k udržování chromatinu v kompaktním stavu (Goodarzi *et al.*, 2011).



Obr. 6 | Role 53BP1 se studovala na čtyřech modelových procesech. | V heterochromatinu opravám dvouvláknových zlomů brání mimo jiné interakce mezi KAP-1 a chromatinovým remodelačním enzymem CHD3. Tato interakce je přerušena fosforylací KAP-1 prostřednictvím kinázy ATM, která je koncentrována v oblastech DNA poškození prostřednictvím 53BP1. | Telomery, které přišly o svůj ochranný proteinový komplex, se brání erozi DNA konců fúzí. Při hledání druhého konce DNA musí být překonány značné vzdálenosti. 53BP1 podporuje tento proces zvýšením mobility telomer v jádře. | Při přestavbách imunoglobulinových genů vznikají štěpením RAG rekombinázami v případě V(D)J rekombinace nebo aktivitou deaminázy AID při izotypovém přesmyku DNA konce. Pro následné správné spojení vzniklých DNA konců a odstranění sekvence mezi místy štěpení jsou důležité oligomery 53BP1. Převzato z Noonové a Goodarziho (2011), upraveno.

6.2. Fúze nechráněných telomer

Konce savčích chromozomů jsou tvořeny rozsáhlými tandemově se opakujícími TTAGGG sekvencemi a 3' jednovláknovým přesahem. Na tyto sekvence a DNA přesah nasedá šest proteinů, které tvoří tzv. shelterin komplex. Telomery mají dvě klíčové funkce. První z nich je ochrana sebe sama před zkracováním v důsledku vrozené funkční limitace replikačního aparátu. Druhou úlohou je zabránit buňce, aby je rozeznávala jako dvouvláknové zlomy, zastavila postup buněčným cyklem a spustila jejich opravu (Jain a Cooper, 2010).

Konce nefunkčních telomer, které přišly o svůj ochranný proteinový komplex, jsou rozeznány jako poškození DNA a jsou asociovány s typickými faktory fokusů jako je γ H2AX, ATM, Mre11 a 53BP1, které se kolem nich začnou akumulovat (Takai *et al.*, 2003). Tyto fokusy se označují jako TIF (telomere dysfunction-induced foci). Ztráta proteinů z ochranného shelterin komplexu vyvolá masivní fúzi telomer. Ta může být vykonána NHEJ, popřípadě jeho variantou A-EJ (alternative end-joining),

kteřá pro svůj průběh vyžaduje vznik krátkého DNA přesahu (Rai *et al.*, 2010). NHEJ telomer probíhá primárně v G1 fázi, zatímco v S a G2 je inhibován prostřednictvím CDK (Konishi a de Lange, 2008). 53BP1 tomuto procesu napomáhá dvěma způsoby. V souladu se svojí obecnou schopností blokovat resekci chrání i tyto DNA konce před degradací (Sfeir a de Lange, 2012). V kontextu fúze telomer se však odhalila jeho další vlastnost. Ukázalo se, že nechráněné telomery jsou více pohyblivé a křižují skrze větší oblasti v jádře. Změna dynamiky chromatinu, která toto umožňuje, je způsobena 53BP1. Jde o lokální změnu, která je pozorována jen v oblastech, které odpovídají akumulaci 53BP1 (Dimitrova *et al.*, 2008). Výsledkem této změny mobility tak je i větší pravděpodobnost, že se konce DNA dostanou do blízkosti jiných a bude moci proběhnout fúze. NHEJ nefunkčních telomer podporuje jak PTIP, tak Rif1. Nicméně Rif1 nemá vliv na mobilitu telomer (Callen *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2013). Vlivem PTIP na změnu této mobility se doposud žádná publikace nezaobírala.

6.3. Tvorba synapsí při přestavbách imunoglobulinových genů

Pro V(D)J rekombinaci a izotypový přesmyk je společné, že během těchto procesů dochází ke vzniku čtyř DNA konců. Sekvence mezi místy štěpení se musí odstranit a nově vzniklé konce záhy spojit. Právě pro tento krok je nepostradatelný 53BP1. Pro jeho funkci v imunitním systému je klíčová jeho oligomerizační doména (Bothmer *et al.*, 2011; Lottersberger *et al.*, 2013). To vedlo k návržení modelu, podle něhož tvoří synapse, které k sobě tyto často dosti vzdálené konce DNA přiblíží, popřípadě zajistí odstranění vystřižené sekvence.

6.3.1. Synapse během V(D)J rekombinaci

V(D)J rekombinace je proces, při kterém se tvoří variabilní úseky protilátek a antigenních receptorů, které rozpoznávají antigen. Při tomto ději se k sobě náhodně sestaví V, D a J segmenty imunoglobulinových genů. K tomuto jevu dochází v časných fázích vývoje lymfocytů. K zahájení tohoto procesu jsou potřeba RAG1/2 (V(D)J recombination-activating protein 1/2) rekombinázy, jejichž exprese je výlučná pro vyvíjející se lymfocyty. RAG rekombinázy štěpí DNA specificky v konzervovaných krátkých signálních sekvencích mezi V, D a J segmenty a mají schopnost vytvářet synapse mezi místy štěpení, což usnadňuje následné spojení sestřižených genů. DNA je opravena pomocí NHEJ (Dudley *et al.*, 2005).

Defekt ve V(D)J rekombinaci v nepřítomnosti 53BP1 byl zpočátku přehlížen (Manis *et al.*, 2004). Ztráta 53BP1 totiž vede k poruše spojování jen vzdálenějších V-DJ segmentů a rozsáhlé degradaci neopravených konců. Výsledkem je porucha integrity imunoglobulinového receptoru, apoptóza a snížení počtu lymfocytů. V souladu s představou o schopnosti RAG rekombináz vytvářet v místě štěpení synapse, není rekombinace mezi blíže ležícími segmenty ovlivněna, ba dokonce v absenci 53BP1 upřednostňována (Difilippantonio *et al.*, 2008).

6.3.2. Synapse během izotypového přesmyku

Izotypový přesmyk je proces, při kterém vznikají protilátky se stejnou antigenní specifitou, ale s jinou efektorovou funkcí. Při tomto ději se delecí odstraní jeden až několik exonů konstantní části imunoglobulinového těžkého řetězce a jako výsledek je pak do proteinu translatován segment konstantní části, který je nejbliž variabilní oblasti. K tomuto jevu dochází během terminální diferenciaci B-lymfocytů po jejich aktivaci antigenem (Dudley *et al.*, 2005).

Celý proces zahajuje deamináza AID (activation-induced cytidine deaminase), jež je exprimována pouze v aktivovaných B-lymfocytech germinálního centra. AID provádí deaminaci cytidinů na jednovláknové DNA. K tomu dochází jen v oblastech rozsáhlých přesmykových sekvencí se zahájenou transkripcí. Nesprávné párování uracilu a guanosinu aktivuje MMR (mismatch repair) systém, který chybné nukleotidy vystřihne. Dvouvláknový zlom vzniká jako důsledek jednovláknových zlomů v těsné blízkosti na obou vláknech DNA (Schrader, 2005; Schrader *et al.*, 2007). Přesmykové sekvence jsou od sebe dosti vzdáleny a před spojením zlomů DNA pomocí NHEJ se tyto konce musí přiblížit.

Ztráta 53BP1 vede k vážným poruchám izotypového přesmyku. Rekombinace na větší vzdálenost mezi přesmykovými sekvencemi, která je klíčová pro správný průběh, je výrazně oslabena. Místo toho dochází k rekombinacím uvnitř přesmykových oblastí (Reina-San-Martin *et al.*, 2007). Jeho roli při spojování vzdálených konců demonstroval i experiment, který ukázal, že v přítomnosti 53BP1 je výrazně efektivnější spojování DNA zlomů vzdálených od sebe přibližně 100 kb. Na úspěšnost spojování těch vzdálených méně než 1,2 kb nebo více než 27 Mb nemá žádný vliv. Tuto schopnost ztratí po odstranění oligomerizační domény (Bothmer *et al.*, 2011). Zdá se proto, že je 53BP1 zapojený do tvorby synapsí mezi přesmykovými oblastmi. V tomto procesu je navíc důležitá i jeho schopnost bránit resekci konců (Bothmer *et al.*, 2010). V souladu s tím snížení exprese Rif1 pomocí RNA interference vede k menšímu defektu v izotypovém přesmyku než snížení exprese 53BP1. PTIP izotypový přesmyk neovlivňuje vůbec (Di Virgilio *et al.*, 2013). Funkce Rif1 a PTIP v blokování resekce se tedy vždy nepřekrývá, ale v různých procesech 53BP1 využívá buď jeden, nebo druhý efektor.

Závěr

53BP1 hraje důležitou roli v buněčné odpovědi na poškození DNA. Prostřednictvím svých Tudor domén a UDR motivu je schopný rozeznat chromatinové značky (methylaci, acetylaci a ubiquitinaci), které byly vytvořeny v oblastech DNA poškození. Tento histonový kód pak přetransformuje prostřednictvím svých interakčních partnerů do efektivní signalizace o DNA poškození a zprostředkuje následné opravy. Pro tuto jeho schopnost se ukazují být klíčové jeho posttranslační modifikace, jejíž funkční charakterizace se zdá být slibnou oblastí dalšího výzkumu.

Mezi nově popsané interakční partnery patří Rif1 a PTIP, kteří jsou zapojeni do regulační smyčky, v které proti sobě stojí 53BP1 a BRCA1 a jejímž výsledkem je volba adekvátní dráhy opravy DNA. Nicméně molekulární mechanismy, které tuto regulaci provázejí, nejsou doposud zcela objasněny. Důležitost poznání těchto mechanismů souvisí s častou asociací mutací v genu pro BRCA1 s rakovinou prsu a vaječníků. Z nádorových onemocnění patří rakovina prsu k těm nejčastějším. Porozumění faktorům a drahám zapojeným do regulace BRCA1 je proto podstatné pro vývoj nových a efektivnějších způsobů léčby těchto nádorů. O tom svědčí i skutečnost, že nádory prsu překonávají působení doposud slibně se jevícího PARP inhibitoru mimo jiné i ztrátou 53BP1.

V opravách dvouvláknových zlomů DNA však hraje 53BP1 i jiné role. Ty se ukazují především ve speciálních případech, kdy je potřeba rozvolnit těsně sbalený heterochromatin, zajistit koncům DNA pohyb přes relativně velké vzdálenosti nebo přiblížit vzdálené konce DNA při programovaných přestavbách imunoglobulinových genů. I tady zůstává nadále výzvou porozumět tomu, jak 53BP1 zprostředkovává tyto změny struktury chromatinu, zvýšenou mobilitu DNA konců a tvorbu synapsí a jak tím přispívá k normálnímu průběhu oprav DNA.

V úvodu byl popsán fenotyp pozorovaný na myším modelu v důsledku poškození genu pro 53BP1. Na základě poznání procesů, do kterých je 53BP1 zapojen, si již můžeme dovolit tvrdit, co může být jeho příčinou. Na závěr tedy může být zajímavé se zaměřit na jeden fakt. I když se funkce jednotlivých faktorů zapojených do buněčné odpovědi na poškození DNA často překrývají a jejich ztráta může být kompenzována, poškození genů pro klíčové faktory se u lidí projevuje vážnými syndromy, jako jsou v první kapitole zmiňované AT, ATLD a NBS. Na základě myšího modelu s defektním *TP53BP1* se dá předpokládat, že i u lidí by se mohl vyskytovat podobný syndrom projevující se poruchou růstu, radiosenzitivitou, imunodeficiencí, chromozomální nestabilitou a sklonem pro tvorbu nádorů. Nicméně žádný lidský syndrom s nefunkčním 53BP1 není doposud spojován. Zdá se proto, že u primátů je jeho porucha neslučitelná s životem. 53BP1 tak může mít další důležité funkce, a to nejenom v embryonálním vývoji.

Literatura

- Acs, K., Luijsterburg, M.S., Ackermann, L., Salomons, F. A., Hoppe, T. a Dantuma, N.P. (2011).** The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1345–1350.
- Adams, M.M., Wang, B., Xia, Z., Morales, J.C., Lu, X., Donehower, L.A., Bochar, D.A., Elledge, S.J. a Carpenter, P.B. (2005).** 53BP1 oligomerization is independent of its methylation by PRMT1. *Cell Cycle* *4*, 1854–1861.
- Anderson, L., Henderson, C. a Adachi, Y. (2001).** Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 1719–1729.
- Bartek, J. a Lukas, J. (2003).** Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* *3*, 421–429.
- Baudat, F., Imai, Y. a de Massy, B. (2013).** Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nat. Rev. Genet.* *14*, 794–806.
- Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Melander, F., Bartek, J. a Lukas, J. (2005).** Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1. *J. Cell Biol.* *170*, 201–211.
- Bekker-Jensen, S. a Mailand, N. (2010).** Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA Repair (Amst).* *9*, 1219–1228.
- Bekker-Jensen, S., Rendtlew Danielsen, J., Fugger, K., Gromova, I., Nerstedt, A., Lukas, C., Bartek, J., Lukas, J. a Mailand, N. (2010).** HERC2 coordinates ubiquitin-dependent assembly of DNA repair factors on damaged chromosomes. *Nat. Cell Biol.* *12*, 80–86.
- Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Conrad, S., Goodarzi, A. A., Krempler, A., Jeggo, P. A. a Löbrich, M. (2009).** ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J.* *28*, 3413–3427.
- Bork, P., Hofmann, K. a Bucher, P. (1997).** a superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J.* *11*, 68–76.
- Bothmer, A., Robbiani, D.F., Feldhahn, N., Gazumyan, A., Nussenzweig, A. a Nussenzweig, M.C. (2010).** 53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination. *J. Exp. Med.* *207*, 855–865.
- Bothmer, A., Robbiani, D. a Virgilio, M. Di (2011).** Regulation of DNA end joining, resection, and immunoglobulin class switch recombination by 53BP1. *Mol. Cell* *42*, 319–329.
- Botuyan, M., Lee, J., Ward, I. a Kim, J. (2006).** Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* *127*, 1361–1373.
- Bouwman, P., Aly, A. a Escandell, J. (2010).** 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 688–695.
- Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J. a Helleday, T. (2005).** Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* *434*, 913–917.
- Bunting, S., Callén, E., Wong, N. a Chen, H. (2010).** 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* *141*, 243–254.
- Callen, E., Virgilio, M. Di, and Kruhlak, M. (2013).** 53BP1 mediates productive and mutagenic DNA repair through distinct phosphoprotein interactions. *Cell* *153*, 1266–1280.
- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B. a Siliciano, J.D. (1998).** Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* *281*, 1677–1679.

- Cao, L., Kim, S., Xiao, C., Wang, R.-H., Coumoul, X., Wang, X., Li, W.M., Xu, X.L., De Soto, J.A., Takai, H., et al. (2006).** ATM-Chk2-p53 activation prevents tumorigenesis at an expense of organ homeostasis upon Brca1 deficiency. *EMBO J.* 25, 2167–2177.
- Cao, L., Xu, X., Bunting, S.F., Liu, J., Wang, R.-H., Cao, L.L., Wu, J.J., Peng, T.-N., Chen, J., Nussenzweig, A., et al. (2009).** a selective requirement for 53BP1 in the biological response to genomic instability induced by Brca1 deficiency. *Mol. Cell* 35, 534–541.
- Cook, P.J., Ju, B.G., Telese, F., Wang, X., Glass, C.K. a Rosenfeld, M.G. (2009).** Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature* 458, 591–596.
- Dai, C. a Gu, W. (2010).** P53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol. Med.* 16, 528–536.
- Deckbar, D., Birraux, J., Krempler, A., Tchouandong, L., Beucher, A., Walker, S., Stiff, T., Jeggo, P. a Löbrich, M. (2007).** Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *J. Cell Biol.* 176, 749–755.
- DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D. a Chu, G. (2002).** Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J.* 21, 3192–3200.
- Derbyshire, D.J., Basu, B.P., Serpell, L.C., Joo, W.S., Date, T., Iwabuchi, K. a Doherty, A.J. (2002).** Crystal structure of human 53BP1 BRCT domains bound to p53 tumour suppressor. *EMBO J.* 21, 3863–3872.
- Difilippantonio, S., Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.-T., Reina San Martin, B., Van Laethem, F., Yang, Y.-P., Petukhova, G. V, Eckhaus, M., Feigenbaum, L., et al. (2005).** Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models. *Nat. Cell Biol.* 7, 675–685.
- Difilippantonio, S., Gapud, E. a Wong, N. (2008).** 53BP1 facilitates long-range DNA end-joining during V(D)J recombination. *Nature* 456, 529–533.
- Dimitrova, N., Chen, Y., Spector, D. a de Lange, T. (2008).** 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature* 456, 524–528.
- DiTullio, R. A, Mochan, T. A, Venere, M., Bartkova, J., Sehested, M., Bartek, J. a Halazonetis, T.D. (2002).** 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nat. Cell Biol.* 4, 998–1002.
- 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.
- Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H. a Alt, F.W. (2005).** Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv. Immunol.* 86, 43–112.
- Dulić, V., Kaufmann, W.K., Wilson, S.J., Tlsty, T.D., Lees, E., Harper, J.W., Elledge, S.J. a Reed, S.I. (1994).** p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76, 1013–1023.
- Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J.T.F., Tkáč, 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.
- Falck, J., Coates, J. a Jackson, S.P. (2005).** Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434, 605–611.

- Falck, J., Forment, J. V, Coates, J., Mistrik, M., Lukas, J., Bartek, J. a Jackson, S.P. (2012).** CDK targeting of NBS1 promotes DNA-end resection, replication restart and homologous recombination. *EMBO Rep.* 13, 561–568.
- Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H. a Weissman, A.M. (2000).** Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.* 275, 8945–8951.
- Feng, L., Fong, K.-W., Wang, J., Wang, W. a Chen, J. (2013).** RIF1 counteracts BRCA1-mediated end resection during DNA repair. *J. Biol. Chem.* 288, 11135–11143.
- Ferguson, A.M., White, L.S., Donovan, P.J. a Piwnica-Worms, H. (2005).** Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatases. *Mol. Cell Biol.* 25, 2853–2860.
- Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.-T., Celeste, A., Ward, I., Romanienko, P.J., Morales, J.C., Naka, K., Xia, Z., Camerini-Otero, R.D., Motoyama, N., *et al.* (2002).** DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat. Cell Biol.* 4, 993–997.
- Fradet-Turcotte, A. a Canny, M. (2013).** 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* 499, 50–54.
- Gatei, M., Sloper, K., Sorensen, C., Syljuäsen, R., Falck, J., Hobson, K., Savage, K., Lukas, J., Zhou, B.-B., Bartek, J., *et al.* (2003).** Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* 278, 14806–14811.
- Gong, Z., Cho, Y.-W., Kim, J.-E., Ge, K. a Chen, J. (2009).** Accumulation of Pax2 transactivation domain interaction protein (PTIP) at sites of DNA breaks via RNF8-dependent pathway is required for cell survival after DNA damage. *J. Biol. Chem.* 284, 7284–7293.
- Goodarzi, A. A., Noon, A.T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Löbrich, M. a Jeggo, P. A. (2008).** ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol. Cell* 31, 167–177.
- Goodarzi, A. A., Kurka, T. a Jeggo, P. A. (2011).** KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 831–839.
- Grabarz, A., Guirouilh-Barbat, J., Barascu, A., Pennarun, G., Genet, D., Rass, E., Germann, S.M.M., Bertrand, P., Hickson, I.D.D. a Lopez, B.S.S. (2013).** a role for BLM in double-strand break repair pathway choice: prevention of CtIP/Mre11-mediated alternative nonhomologous end-joining. *Cell Rep.* 5, 21–28.
- Gu, W. a Roeder, R.G. (1997).** Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595–606.
- Hardy, C.F., Sussel, L. a Shore, D. (1992).** a RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev.* 6, 801–814.
- Hari, F.J., Spycher, C., Jungmichel, S., Pavic, L. a Stucki, M. (2010).** a divalent FHA/BRCT-binding mechanism couples the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin. *EMBO Rep.* 11, 387–392.
- Harrigan, J. A., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Dimitrova, D.S., Polo, S.E., Bradshaw, C.R., Fraser, P. a Jackson, S.P. (2011).** Replication stress induces 53BP1-containing OPT domains in G1 cells. *J. Cell Biol.* 193, 97–108.
- Heyer, W.-D., Ehmsen, K.T. a Liu, J. (2010).** Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 44, 113–139.

- Hopfner, K.P., Karcher, A., Craig, L., Woo, T.T., Carney, J.P. a Tainer, J. A. (2001).** Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* 105, 473–485.
- Hsiao, K.-Y. a Mizzen, C. A. (2013).** Histone H4 deacetylation facilitates 53BP1 DNA damage signaling and double-strand break repair. *J. Mol. Cell Biol.* 5, 157–165.
- Huen, M., Huang, J., Leung, J. a Sy, S. (2010).** Regulation of chromatin architecture by the PWWP domain-containing DNA damage-responsive factor EXPAND1/MUM1. *Mol. Cell* 37, 854–864.
- Huertas, P. a Jackson, S.P. (2009).** Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J. Biol. Chem.* 284, 9558–9565.
- Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R. A., Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Petty, T.J., Sheston, E. A., Mellert, H.S., Stavridi, E.S. a Halazonetis, T.D. (2004).** Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* 432, 406–411.
- Chapman, J.R., Barral, P., Vannier, J.-B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., Sartori, A. A., Adams, I.R., Batista, F.D. a 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.
- Chen, L., Nievera, C.J., Lee, A.Y.-L. a Wu, X. (2008).** Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *J. Biol. Chem.* 283, 7713–7720.
- Cho, Y., Hong, T., Hong, S., Guo, H., Yu, H., Kim, D., Guszczynski, T., Dressler, G.R., Copeland, T.D., Kalkum, M., *et al.* (2007).** PTIP associates with MLL3- and MLL4-containing histone H3 lysine 4 methyltransferase complex. *J. Biol. Chem.* 282, 20395–20406.
- Iwabuchi, K., Bartel, P.L., Li, B., Marraccino, R. a Fields, S. (1994).** Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 6098–6102.
- Iwabuchi, K., Li, B., Massa, H.F., Trask, B.J., Date, T. a Fields, S. (1998).** Stimulation of p53-mediated transcriptional activation by the p53-binding proteins, 53BP1 and 53BP2. *J. Biol. Chem.* 273, 26061–26068.
- Jackson, S. a Bartek, J. (2009).** The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078.
- Jain, D. a Cooper, J.P. (2010).** Telomeric strategies: means to an end. *Annu. Rev. Genet.* 44, 243–269.
- Jaspers, J.E., Kersbergen, A., Boon, U., Sol, W., van Deemter, L., Zander, S. A., Drost, R., Wientjens, E., Ji, J., Aly, A., *et al.* (2013).** Loss of 53BP1 causes PARP inhibitor resistance in Brca1-mutated mouse mammary tumors. *Cancer Discov.* 3, 68–81.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C.M., Lukas, J. a 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.
- Jin, J., Ang, X.L., Ye, X., Livingstone, M. a Harper, J.W. (2008).** Differential roles for checkpoint kinases in DNA damage-dependent degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 283, 19322–19328.
- Joo, W.S., Jeffrey, P.D., Cantor, S.B., Finnin, M.S., Livingston, D.M. a Pavletich, N.P. (2002).** Structure of the 53BP1 BRCT region bound to p53 and its comparison to the Brca1 BRCT structure. *Genes Dev.* 16, 583–593.
- Jowsey, P., Morrice, N. A., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Toth, R. a Rouse, J. (2007).** Characterisation of the sites of DNA damage-induced 53BP1 phosphorylation catalysed by ATM and ATR. *DNA Repair (Amst).* 6, 1536–1544.
- Jullien, D., Vagnarelli, P., Earnshaw, W.C. a Adachi, Y. (2002).** Kinetochores localisation of the DNA damage response component 53BP1 during mitosis. *J. Cell Sci.* 115, 71–79.

- Kim, H., Chen, J. a Yu, X. (2007).** Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response. *Science* 316, 1202–1205.
- Kim, S., Lim, D., Canman, C. a Kastan, M. (1999).** Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J. Biol. Chem.* 274, 37538–37543.
- Konishi, A. a de Lange, T. (2008).** Cell cycle control of telomere protection and NHEJ revealed by a ts mutation in the DNA-binding domain of TRF2. *Genes Dev.* 22, 1221–1230.
- Koonin, E. V, Altschul, S.F. a Bork, P. (1996)....** Functional motifs... *Nat. Genet.* 13, 266–268.
- Lee, D.-H., Acharya, S.S., Kwon, M., Drane, P., Guan, Y., Adelmant, G., Kaley, P., Shah, J., Pellman, D., Marto, J.A., et al. (2014).** Dephosphorylation enables the recruitment of 53BP1 to double-strand DNA breaks. *Mol. Cell* 1–14.
- Lee, J.-H., Goodarzi, A. A., Jeggo, P. A. a Paull, T.T. (2010).** 53BP1 promotes ATM activity through direct interactions with the MRN complex. *EMBO J.* 29, 574–585.
- Leung, C.C.Y. a Glover, J.N.M. (2011).** BRCT domains: Easy as one, two, three. *Cell Cycle* 10, 2461–2470.
- Li, H., Fischle, W., Wang, W., Duncan, E.M., Liang, L., Murakami-Ishibe, S., Allis, C.D. a Patel, D.J. (2007).** Structural basis for lower lysine methylation state-specific readout by MBT repeats of L3MBTL1 and an engineered PHD finger. *Mol. Cell* 28, 677–691.
- Llorente, B., Smith, C.E. a Symington, L.S. (2008).** Break-induced replication: what is it and what is it for? *Cell Cycle* 7, 859–864.
- Lo, K.W.-H., Kan, H.-M., Chan, L.-N., Xu, W.-G., Wang, K.-P., Wu, Z., Sheng, M. a Zhang, M. (2005).** The 8-kDa dynein light chain binds to p53-binding protein 1 and mediates DNA damage-induced p53 nuclear accumulation. *J. Biol. Chem.* 280, 8172–8179.
- Lottersberger, F., Bothmer, A., Robbiani, D.F., Nussenzweig, M.C. a de Lange, T. (2013).** Role of 53BP1 oligomerization in regulating double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 2146–2151.
- Lu, R. a Wang, G.G. (2013).** Tudor: a versatile family of histone methylation “readers”. *Trends Biochem. Sci.* 38, 546–555.
- Lukas, J., Lukas, C. a Bartek, J. (2004).** Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst).* 3, 997–1007.
- Lukas, J., Lukas, C. a Bartek, J. (2011a).** More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat. Cell Biol.* 13, 1161–1169.
- Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Pedersen, R.S., Grøfte, M., Chan, K.L., Hickson, I.D., Bartek, J., et al. (2011b).** 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat. Cell Biol.* 13, 243–253.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuâsen, R.G., Welcker, M., Bartek, J. a Lukas, J. (2000).** Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* 288, 1425–1429.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C. a Lukas, J. (2007).** RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* 131, 887–900.
- Mallette, F. A., Mattioli, F., Cui, G., Young, L.C., Hendzel, M.J., Mer, G., Sixma, T.K. a Richard, S. (2012).** RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites. *EMBO J.* 31, 1865–1878.
- Manis, J.P., Morales, J.C., Xia, Z., Kutok, J.L., Alt, F.W. a Carpenter, P.B. (2004).** 53BP1 links DNA damage-response pathways to immunoglobulin heavy chain class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 5, 481–487.

- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K. a Elledge, S.J. (2000).** Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 10389–10394.
- Matsuoka, S., Ballif, B. A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., *et al.* (2007).** ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* *316*, 1160–1166.
- Mattioli, F., Vissers, J.H. A., van Dijk, W.J., Ikpa, P., Citterio, E., Vermeulen, W., Marteijs, J. A. a Sixma, T.K. (2012).** RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. *Cell* *150*, 1182–1195.
- McKerlie, M. a Zhu, X.-D. (2011).** Cyclin B-dependent kinase 1 regulates human TRF1 to modulate the resolution of sister telomeres. *Nat. Commun.* *2*, 371.
- McKerlie, M., Walker, J.R., Mitchell, T.R.H., Wilson, F.R. a Zhu, X.-D. (2013).** Phosphorylated (pT371)TRF1 is recruited to sites of DNA damage to facilitate homologous recombination and checkpoint activation. *Nucleic Acids Res.* *41*, 10268–10282.
- Melander, F., Bekker-Jensen, S., Falck, J., Bartek, J., Mailand, N. a Lukas, J. (2008).** Phosphorylation of SDT repeats in the MDC1 N terminus triggers retention of NBS1 at the DNA damage-modified chromatin. *J. Cell Biol.* *181*, 213–226.
- Mochan, T. A., Venere, M., DiTullio, R. A. a Halazonetis, T.D. (2004).** 53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst).* *3*, 945–952.
- Morales, J.C., Xia, Z., Lu, T., Aldrich, M.B., Wang, B., Rosales, C., Kellems, R.E., Hittelman, W.N., Elledge, S.J. a Carpenter, P.B. (2003).** Role for the BRCA1 C-terminal repeats (BRCT) protein 53BP1 in maintaining genomic stability. *J. Biol. Chem.* *278*, 14971–14977.
- Moudry, P., Lukas, C., Macurek, L., Neumann, B., Heriche, J.-K., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Hodny, Z., Lukas, J. a Bartek, J. (2012).** Nucleoporin NUP153 guards genome integrity by promoting nuclear import of 53BP1. *Cell Death Differ.* *19*, 798–807.
- Nimonkar, A. V, Ozsoy, A. Z., Genschel, J., Modrich, P. a Kowalczykowski, S.C. (2008).** Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 16906–16911.
- Noon, A.T., Shibata, A., Rief, N., Löbrich, M., Stewart, G.S., Jeggo, P. A. a Goodarzi, A. A. (2010).** 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. *Nat. Cell Biol.* *12*, 177–184.
- Noon, A.T. a Goodarzi, A. A. (2011).** 53BP1-mediated DNA double strand break repair: insert bad pun here. *DNA Repair (Amst).* *10*, 1071–1076.
- Oda, H., Hübner, M.R., Beck, D.B., Vermeulen, M., Hurwitz, J., Spector, D.L. a Reinberg, D. (2010).** Regulation of the histone H4 monomethylase PR-Set7 by CRL4(Cdt2)-mediated PCNA-dependent degradation during DNA damage. *Mol. Cell* *40*, 364–376.
- Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Noordermeer, S.M., Canny, M.D., Brun, C.M., Strecker, J., Escibano-Diaz, C. a Durocher, D. (2014).** Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. *Science* *344*, 189–193.
- Panier, S. a Boulton, S.J. (2014).** Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 7–18.
- Patel, S.R., Kim, D., Levitan, I. a Dressler, G.R. (2007).** The BRCT-domain containing protein PTIP links PAX2 to a histone H3, lysine 4 methyltransferase complex. *Dev. Cell* *13*, 580–592.
- Pei, H., Zhang, L., Luo, K., Qin, Y. a Chesi, M. (2011).** MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature* *470*, 124–128.

- Pfeiffer, P., Goedecke, W. a Obe, G. (2000).** Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* *15*, 289–302.
- Pombo, A., Cuello, P., Schul, W., Yoon, J.B., Roeder, R.G., Cook, P.R. a Murphy, S. (1998).** Regional and temporal specialization in the nucleus: a transcriptionally-active nuclear domain rich in PTF, Oct1 and PIKA antigens associates with specific chromosomes early in the cell cycle. *EMBO J.* *17*, 1768–1778.
- Rai, R., Zheng, H., He, H., Luo, Y., Multani, A., Carpenter, P.B. a Chang, S. (2010).** The function of classical and alternative non-homologous end-joining pathways in the fusion of dysfunctional telomeres. *EMBO J.* *29*, 2598–2610.
- Rapali, P., Szenes, Á., Radnai, L., Bakos, A., Pál, G. a Nyitray, L. (2011).** DYNLL/LC8: a light chain subunit of the dynein motor complex and beyond. *FEBS J.* *278*, 2980–2996.
- Rappold, I., Iwabuchi, K., Date, T. a Chen, J. (2001).** Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage–signaling pathways. *J. Cell Biol.* *153*, 613–620.
- Reina-San-Martin, B., Chen, J., Nussenzweig, A. a Nussenzweig, M.C. (2007).** Enhanced intra-switch region recombination during immunoglobulin class switch recombination in 53BP1^{-/-} B cells. *Eur. J. Immunol.* *37*, 235–239.
- Riballo, E., Kühne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G.C.M., Recio, M.-J., Reis, C., Dahm, K., Fricke, A., Krempler, A., *et al.* (2004).** a pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol. Cell* *16*, 715–724.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. a Bonner, W.M. (1998).** DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* *273*, 5858–5868.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. a Bonner, W.M. (1999).** Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* *146*, 905–916.
- Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L.H. a Löbrich, M. (2003).** Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 5706–5715.
- Saka, Y., Esashi, F., Matsusaka, T., Mochida, S. a Yanagida, M. (1997).** Damage and replication checkpoint control in fission yeast is ensured by interactions of Crb2, a protein with BRCT motif, with Cut5 and Chk1. *Genes Dev.* *11*, 3387–3400.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J. a Jackson, S.P. (2007).** Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* *450*, 509–514.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D. A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., *et al.* (1995).** a single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* *268*, 1749–1753.
- Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T. a Livingston, D.M. (1997).** Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* *88*, 265–275.
- Sfeir, A. a de Lange, T. (2012).** Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. *Science* (80-.). *336*, 593–597.
- Shanbhag, N.M., Rafalska-Metcalf, I.U., Balane-Bolivar, C., Janicki, S.M. a Greenberg, R. A. (2010).** ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell* *141*, 970–981.
- Shibata, A., Barton, O., Noon, A.T., Dahm, K., Deckbar, D., Goodarzi, A. A., Löbrich, M. a 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.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y. a Prives, C. (1997).** DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* *91*, 325–334.

- Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. a 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.
- Schlegel, B.P., Jodelka, F.M. a Nunez, R. (2006).** BRCA1 promotes induction of ssDNA by ionizing radiation. *Cancer Res.* *66*, 5181–5189.
- Schotta, G., Sengupta, R., Kubicek, S., Malin, S., Kauer, M., Callén, E., Celeste, A., Pagani, M., Opravil, S., De La Rosa-Velazquez, I.A., *et al.* (2008).** a chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes Dev.* *22*, 2048–2061.
- Schrader, C.E. (2005).** Inducible DNA breaks in Ig s regions are dependent on AID and UNG. *J. Exp. Med.* *202*, 561–568.
- Schrader, C.E., Guikema, J.E.J., Linehan, E.K., Selsing, E. a Stavnezer, J. (2007).** Activation-induced cytidine deaminase-dependent DNA breaks in class switch recombination occur during G1 phase of the cell cycle and depend upon mismatch repair. *J. Immunol.* *179*, 6064–6071.
- Schultz, L.B., Chehab, N.H., Malikzay, A. a Halazonetis, T.D. (2000).** p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* *151*, 1381–1390.
- Silverman, J., Takai, H., Buonomo, S.B.C., Eisenhaber, F. a de Lange, T. (2004).** Human Rif1, ortholog of a yeast telomeric protein, is regulated by ATM and 53BP1 and functions in the S-phase checkpoint. *Genes Dev.* *18*, 2108–2119.
- Sobhian, B., Shao, G., Lilli, D.R., Culhane, A.C., Moreau, L. A., Xia, B., Livingston, D.M. a Greenberg, R. A. (2007).** RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science* *316*, 1198–1202.
- Stewart, G.S., Maser, R.S., Stankovic, T., Bressan, D. A., Kaplan, M.I., Jaspers, N.G., Raams, A., Byrd, P.J., Petrini, J.H. a Taylor, A. M. (1999).** The DNA double-strand break repair gene *hMRE11* is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* *99*, 577–587.
- Stewart, G.S., Panier, S., Townsend, K., Al-Hakim, A.K., Kolas, N.K., Miller, E.S., Nakada, S., Ylanko, J., Olivarius, S., Mendez, M., *et al.* (2009).** The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell* *136*, 420–434.
- Stiff, T., O’Driscoll, M., Rief, N. a Iwabuchi, K. (2004).** ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* *64*, 2390–2396.
- Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J. a Jackson, S.P. (2005).** MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* *123*, 1213–1226.
- Takai, H., Smogorzewska, A. a de Lange, T. (2003).** DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *13*, 1549–1556.
- Tang, J., Cho, N.W., Cui, G., Manion, E.M., Shanbhag, N.M., Botuyan, M.V., Mer, G. a Greenberg, R.A. (2013).** Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 317–325.
- Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C. a Abraham, R.T. (1999).** a role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* *13*, 152–157.
- Varon, R., Vissinga, C., Platzer, M., Cerosaletti, K.M., Chrzanowska, K.H., Saar, K., Beckmann, G., Seemanová, E., Cooper, P.R., Nowak, N.J., *et al.* (1998).** Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* *93*, 467–476.

- 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.
- Van Vugt, M. A. T.M., Gardino, A.K., Linding, R., Ostheimer, G.J., Reinhardt, H.C., Ong, S.-E., Tan, C.S., Miao, H., Keezer, S.M., Li, J., et al. (2010).** a mitotic phosphorylation feedback network connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to inactivate the G(2)/M DNA damage checkpoint. *PLoS Biol.* 8, e1000287.
- Wang, B., Matsuoka, S., Carpenter, P.B. a Elledge, S.J. (2002).** 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* 298, 1435–1438.
- Wang, B., Matsuoka, S., Ballif, B. A., Zhang, D., Smogorzewska, A., Gygi, S.P. a Elledge, S.J. (2007).** Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science* 316, 1194–1198.
- Wang, C. a Lees-Miller, S.P. (2013).** Detection and repair of ionizing radiation-induced DNA double strand breaks: new developments in nonhomologous end joining. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 86, 440–449.
- Ward, I.M., Minn, K., van Deursen, J. a Chen, J. (2003).** p53 Binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2556–2563.
- Weinert, T.A. a Hartwell, L.H. (1988).** The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 241, 317–322.
- Willson, J., Wilson, S., Warr, N. a Watts, F.Z. (1997).** Isolation and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe rhp9* gene: a gene required for the DNA damage checkpoint but not the replication checkpoint. *Nucleic Acids Res.* 25, 2138–2146.
- Wilson, T.E., Grawunder, U. a Lieber, M.R. (1997).** Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. *Nature* 388, 495–498.
- Woodhouse, B.C., Dianova, I.I., Parsons, J.L. a Dianov, G.L. (2008).** Poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates DNA repair capacity and prevents formation of DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst).* 7, 932–940.
- Wu, J., Huen, M.S.Y., Lu, L.-Y., Ye, L., Dou, Y., Ljungman, M., Chen, J. a Yu, X. (2009).** Histone ubiquitination associates with BRCA1-dependent DNA damage response. *Mol. Cell. Biol.* 29, 849–860.
- Xia, Z., Morales, J.C., Dunphy, W.G. a Carpenter, P.B. (2001).** Negative cell cycle regulation and DNA damage-inducible phosphorylation of the BRCT protein 53BP1. *J. Biol. Chem.* 276, 2708–2718.
- Xu, X., Qiao, W., Linke, S.P., Cao, L., Li, W.M., Furth, P. A., Harris, C.C. a Deng, C.X. (2001).** Genetic interactions between tumor suppressors *Brcal* and p53 in apoptosis, cell cycle and tumorigenesis. *Nat. Genet.* 28, 266–271.
- Yu, X. a Chen, J. (2004).** DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9478–9486.
- Zgheib, O., Pataky, K., Brugger, J. a Halazonetis, T.D. (2009).** An oligomerized 53BP1 tudor domain suffices for recognition of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1050–1058.
- Zhao, H. a Piwnica-Worms, H. (2001).** ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4129–4139.
- Zimmermann, M., Lottersberger, F., Buonomo, S.B., Sfeir, A. a de Lange, T. (2013).** 53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5' end resection. *Science* 339, 700–704.

- Zimmermann, M. a de Lange, T. (2014).** 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends Cell Biol.* 24, 108–117.
- Ziv, Y., Bielopolski, D., Galanty, Y., Lukas, C., Taya, Y., Schultz, D.C., Lukas, J., Bekker-Jensen, S., Bartek, J. a Shiloh, Y. (2006).** Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat. Cell Biol.* 8, 870–876.
- Zou, L. a Elledge, S.J. (2003).** Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542–1548.