

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

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



**Radmila Kudláčková**

Role Polo-like kináz v regulaci buněčného cyklu a odpovědi na poškození DNA  
Role of Polo-like kinases in the cell cycle and DNA damage response

Bakalářská práce

Školitel: MUDr. Libor Macůrek, Ph.D.

Praha, 2014



## Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli MUDr. Liborovi Macůrkovi, Ph.D. za jeho nekonečnou trpělivost a cenné rady a své rodině za podporu při vypracování této práce.

## Prohlášení

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

V Praze, 05. 08. 2014

Radmila Kudláčková



# Abstrakt

Při každém buněčném dělení musí dojít k rovnoměrnému rozdělení genetického materiálu do obou dceřiných buněk. V další fázi se musí chybějící část genomu dosyntetizovat. Celý cyklus podléhá regulaci ze strany cyklin-dependentních kináz (Cdk) ve spolupráci s cykliny. Dojde-li v průběhu buněčného cyklu k poškození DNA, signální dráhy kontrolních bodů potlačí průběh cyklem a zajistí, aby se buňka nedělila, dokud nebude zjednána náprava. Pokud kontrolní body neplní svoji funkci, dochází k nádorovému bujení. Polo-like kinázy (Plk) jsou stejně jako Cdk důležitými regulátory buněčného cyklu. Plní řadu funkcí především v mitóze, ale i v odpovědi na DNA poškození. Tato práce je zaměřena zejména na lidské homology, nicméně konzervovanost homologů mezi organismy je značná, tudíž uvedené poznatky mají obecnější platnost. Lidské buňky exprimují pět proteinů z rodiny Polo-like kináz, z nichž Plk1 odpovídá Polo-like kinázám nižších eukaryot. Poznatky o ostatních čtyřech kinázách jsou teprve na vzestupu.

## Klíčová slova

Buněčný cyklus, protein kináza, kontrolní bod buněčného cyklu, DNA poškození, fosforylace, dělicí vřeténko, centrozom.

# Abstract

Within the process of cell division, genetic material must be equally distributed between the two daughter cells. In the next phase, the missing portion of the genome must be synthesized. The entire cycle is regulated by cyclin-dependent kinases (Cdks) in cooperation with cyclins. If the DNA is damaged during the cell cycle, signaling pathways of checkpoints suppress cycle progression and enforce the cell cycle arrest until the damage is repaired. Malfunction of the checkpoints results in tumorigenesis. Polo-like kinases (Plks) are, much like Cdks, important regulators of the cell cycle. Plks play significant role mainly in the mitosis and also in a response to the DNA damage. This thesis is focused on human homologues, nevertheless conservation of homologues among organisms is considerable, thus presented findings are of general relevance. Human cells express five proteins from the family of Polo-like kinases, from which Plk1 corresponds to Polo-like kinases of lower eukaryotes. Knowledge on the remaining four kinases is still on the rise.

## Key words

Cell cycle, protein kinase, cell cycle checkpoint, DNA damage, phosphorylation, mitotic spindle, centrosome.

# Obsah

Seznam zkratk.....	9
Úvod.....	11
1 Buněčný cyklus.....	12
1.1 Interfáze.....	12
1.2 M fáze.....	12
1.3 Cytokineze .....	13
1.4 Regulace buněčného cyklu.....	13
1.4.1 Regulace G1/S přechodu.....	13
1.4.2 Regulace duplikace centrozomů.....	13
1.4.3 Regulace G2/M přechodu .....	14
1.4.4 Separace chromatid .....	15
1.4.5 Anafázi-podporující komplex/cyklozóm (APC/C) .....	15
2 Kontrolní body buněčného cyklu.....	16
2.1 Restrikční bod (R bod) .....	16
2.2 G1 kontrolní bod reagující na poškození DNA.....	17
2.3 S-fázový kontrolní bod .....	17
2.4 G2/M kontrolní bod.....	18
2.5 Kontrolní bod připojení dělicího vřeténka (SAC).....	19
3 Polo-like kinázy.....	20
3.1 Obecná charakteristika Polo-like kináz.....	20
3.2 Polo-like kináza 1 (Plk1).....	21
3.2.1 N-terminální doména .....	21
3.2.2 T-smyčka.....	21
3.2.3 D-box .....	21
3.2.4 C-terminální doména.....	22
3.2.5 Exprese a aktivita Plk1.....	22
3.2.6 Lokalizace Plk1 v buňce .....	23

3.2.7	Role Plk1 v průběhu mitózy.....	23
3.2.8	Plk1 v nádorech .....	25
3.3	Polo-like kináza 2 (Plk2).....	26
3.4	Polo-like kináza 3 (Plk3).....	26
3.5	Polo-like kináza 4 (Plk4).....	27
	Závěr.....	28
	Literatura.....	29



# Seznam zkratek

APC/C	Anafázi podporující komplex/cyklozóm
ATP	Adenosintrifosfát
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
Bub1	Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kináza Bub1
BubR1	Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kináza Bub1 beta
Bub3	Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kináza Bub1 beta
CAK	Cyklin-dependentní kinázu aktivující kináza
Cdc5	Cell division cycle 5
Cdc20	Cell division cycle 20
Cdc25	Cell division cycle 25
Cdc25A	Cell division cycle 25A
Cdc45	Cell division cycle 45
Cdh1	Cdc20 homolog 1
Cdk	Cyklin-dependentní kináza
Cdk1	Cyklin-dependentní kináza 1
Cdk2	Cyklin-dependentní kináza 2
Cdk4	Cyklin-dependentní kináza 4
Cdk6	Cyklin-dependentní kináza 6
Cdk7	Cyklin-dependentní kináza 7
CENP-E	Centromere-associated protein E
Chk1	Checkpoint kináza 1
Chk2	Checkpoint kináza 2
D-box	Destrukční box
dNTP	Deoxyribonuklotidtrifosfát
Fnk	Fibroblast growth factor-inducible kináza
GDP	Guanosindifosfát
GTP	Guanosintrifosfát
GTPáza	GTP fosfohydroláza
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-inducible factor-1 alfa
HU	Hydroxyurea
INCENP	Inner centromere protein

Mad1	Mitotic spindle assembly checkpoint protein Mad1
Mad2	Mitotic spindle assembly checkpoint protein Mad2
MCC	Komplex mitotického kontrolního bodu
Mdm2	Mouse double minute 2
Mre11	Double-strand break repair protein
MTOC	Mikrotubuly organizující centrum
Myt1	Membrane-associated tyrosine- and threonine- specific Cdc2-inhibitory kináza
NES	Jaderný exportní signál
p21	Inhibitor cyklin-dependentní kinázy 1
p53	Protein 53
PBD	Polo-box doména
Plk1	Polo-like kináza 1
Plk2	Polo-like kináza 2
Plk3	Polo-like kináza 3
Plk4	Polo-like kináza 4
Plk5	Polo-like kináza 5
Prk	Proliferation-related kináza
R bod	Restrikční bod
Rad50	DNA repair protein Rad50
Rb	Retinoblastomovým proteinem
RhoA	Transformující protein RhoA
RhoGAP Cyk-4	Rac GTPázu-aktivující protein 1
RhoGEF Ect2	Epithelial cell-transforming sequence 2 oncogene
RNAi	RNA interference
SAC	Kontrolní bod připojení dělicího vřeténka
Sak	Snk/Plk akin kináza
Ser	Serin
Snk	Serum-inducible kináza
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
Wee1	Protein kináza Wee1
wt-Plk	Přirozeně se vyskytující „wild type“ Plk
Xrs2	DNA repair protein Xrs2

# Úvod

Buňky prochází buněčným cyklem, jehož hlavní funkcí je dělení a růst buněk. Buněčný cyklus musí být řádně regulován, aby nedošlo k nekontrolovatelnému nádorovému bujení. Hlavními regulátory jsou cyklin-dependentní kinázy (Cdk), které fungují v komplexu s jejich aktivátory cykliny. Úrovně hladin proteinů Cdk se v průběhu cyklu nemění, zatímco úrovně hladin cyklinů kolísají v závislosti na jejich syntéze a destrukci. Komplexy Cdk-cyklin fosforylují další proteiny a tím regulují jejich aktivitu.

S objevem Polo-like kináz se ukázalo, že vedle Cdk jsou v buňce i další velmi důležité regulátory buněčného cyklu. Polo-like kinázy patří do rodiny serin/threoninových protein kináz, které jsou velmi konzervované mezi organismy. Na N-konci mají katalyticky aktivní kinázovou doménu, která jim přisuzuje vlastnost fosforylovat jiné proteiny a tím regulovat jejich aktivitu. Na C-konci je charakterizuje Polo-box doména obsahující dvě sekvence zvané Polo-boxy, která plní funkci v lokalizaci proteinu na správné místo a v regulaci aktivity proteinu. Prvním objeveným homologem byl protein polo u *Drosophily melanogaster*, jehož mutace vedla k defektům v mitóze a cytokinezi a dal rodině jméno. Následně byly objevovány další homology u nižších eukaryot, u kterých se ukázalo, že také mají funkci v mitóze.

Lidské buňky exprimují pět proteinů z rodiny Polo-like kináz, ale pouze čtyři z nich mají kinázovou aktivitu. Polo-like kináza 1 je protein plnící řadu funkcí v mitóze a odpovídá svojí funkcí homologům nižších eukaryot. Účastní se vstupu buňky do mitózy po DNA poškození, maturace centrozomů a tvorby dělicího vřeténka, připojení vřeténka ke kinetochorům chromatid, cytokineze a výstupu buňky z mitózy. Polo-like kináza 2 má úlohu v duplikaci centriol, embryonálním vývoji kostry a plasticitě synapsí. Polo-like kináza 3 pravděpodobně sehraje roli v rozpadu Golgiho aparátu, regulaci aktinového cytoskeletu, v expresi Cyklinu E, v přechodu G1/S fází a v reakci na DNA poškození. Polo-like kináza 4 se od předešlých Polo-like kináz liší ve své struktuře. Na C-konci obsahuje pouze jednu Polo-box sekvenci. Funkce Polo-like kinázy 4 byla dosud zjištěna pouze v duplikaci centriol. Polo-like kináza 5 se od zbylých kináz liší absencí kinázové domény, takže postrádá katalytickou funkci.

Hlavním cílem této práce je shrnout dosavadní znalosti o struktuře a funkci Polo-like kináz v buněčném cyklu, zejména ze strany lidských homologů, s důrazem na Polo-like kinázu 1.

# 1 Buněčný cyklus

Účelem buněčného cyklu je rovnocenné rozdělení eukaryotické buňky na dvě nové. Buněčný cyklus je tvořen čtyřmi fázemi: G1 (gap 1), S (syntetickou), G2 (gap 2) a M (mitotickou) fází. G1, S a G2 fáze jsou souhrnně nazývány interfáze. Jaderné dělení probíhá v M fázi neboli mitóze a obvykle bývá následováno buněčným dělením zvaným cytokineze. Délka trvání jednotlivých fází buněčného cyklu se mezi jednotlivými druhy organismů liší. V savčích buňkách celý cyklus trvá přibližně dvacet čtyři hodin.

## 1.1 Interfáze

Interfáze začíná nejdelší fází buněčného cyklu a tou je G1 fáze. V G1 fázi buňka dorůstá do velikosti, kterou měla před dělením a připravuje se na S fázi.

Jestliže buňka obdrží signál k dělení, vstoupí do S fáze. V S fázi se duplikují centrozomy a replikuje se DNA. Každý centrozom obsahuje dvě centrioly: jednu mateřskou a jednu dceřinou. Při duplikaci se k oběma centriolám syntetizuje nová dceřiná centriola, takže po duplikaci jsou v buňce přítomny celkem čtyři centrioly. Z jedné sesterské chromatidy vznikají opět dvě, které jsou k sobě připojeny pomocí proteinu Kohezinu.

Poslední, nejkratší část interfáze je G2 fáze. Tato fáze je přípravou na mitózu. Buňka hromadí potřebné enzymy a po překročení prahové úrovně začíná mitóza.

## 1.2 M fáze

M fáze trvá přibližně jen jednu hodinu, ale je nejkomplikovanější částí buněčného cyklu. Děje probíhající v mitóze dělíme na pět pomyslných celků: profázi, prometáfázi, metafázi, anafázi a telofázi.

V průběhu profáze kondenzuje chromatin, již duplikovaný centrozom putuje k budoucím pólům buňky, kde slouží jako mikrotubuly organizující centrum (MTOC) a mění se dynamika a lokalizace mikrotubulárních struktur cytoskeletu, které se shromažďují u MTOC a vytváří dělicí vřeténko.

V následující prometáfázi se rozpadá jaderná membrána a dělicí vřeténko se připojuje ke kinetochorům chromatid v oblasti centromery chromozómu. Na každou chromatidu se připojuje jedno vřeténko z opačného pólu, než na chromatidu sesterskou.

Dynamika dělicích vřetének způsobí vyrovnaní chromozómů do ekvatoriální roviny tzv. metafázní destičky uprostřed mezi póly buňky. Tím začíná metafáze, ve které chromozómy oscilují v ekvatoriální rovině pod napětím mikrotubulů a také dochází k přípravě na separaci sesterských chromatid, které jsou zatím spojeny v oblasti centromery.

V anafázi dochází k oddělení sesterských chromatid a jejich přesunu k opačným pólům buňky, které se od sebe také oddalují.

Poslední fází je telofáze, při níž se obnovují jaderné membrány kolem dekonduujícího chromatinu na obou pólech buňky.

## 1.3 Cytokineze

Při buněčném dělení se buňka začíná zaškrcovat v oblasti předchozí metafázní destičky pomocí aktinomyosinového kontraktálního kruhu. Výsledkem zaškrcování je vznik dvou nových buněk se shodnou genetickou výbavou.

## 1.4 Regulace buněčného cyklu

Buněčný cyklus je ve svém průběhu regulován třemi základními mechanismy: fosforylací, regulovanou transkripcí a řízenou degradací proteinů. Hlavní úlohu v regulaci pomocí fosforylace sehrávají cyklin-dependentní kinázy (Cdk), které tvoří komplexy s cykliny. Transkripci reguluje E2F transkripční faktor, který je inhibován Retinoblastomovým proteinem (Rb) (Weintraub et al., 1992) a degradaci proteinů zajišťuje anafázi-podporující komplex/cyklozóm (APC/C = anaphase-promoting complex/cyclosome) ve spolupráci s proteazomem.

### 1.4.1 Regulace G1/S přechodu

Výstup z G1 fáze je pod kontrolou komplexů Cyklin-dependentní kináza 4-Cyklin D (Cdk4-Cyklin D) a Cyklin-dependentní kináza 6-Cyklin D (Cdk6-Cyklin D). Přejít G1/S fází a průběh S fáze reguluje Cyklin A a Cyklin E v komplexu s Cyklin-dependentní kinázou 2 (Cdk2). Cdk4-Cyklin D, Cdk6-Cyklin D a Cdk2-Cyklin E jsou zodpovědné za fosforylací Rb proteinu (shrnuto v Sánchez & Dynlacht, 2005). Hypofosforylovaný Rb protein vazbou na aktivační doménu E2F transkripčního faktoru inhibuje jeho funkci v aktivaci promotorů genů účastnících se regulace buněčného cyklu. Po fosforylací Rb proteinu dojde k oddělení E2F transkripčního faktoru a ten se stává pozitivním regulátorem promotorů genů a buňka může pokračovat buněčným cyklem (Weintraub et al., 1992). Jedním z takto regulovaných genů je i Cyklin A a Cyklin E (DeGregori et al., 1995).

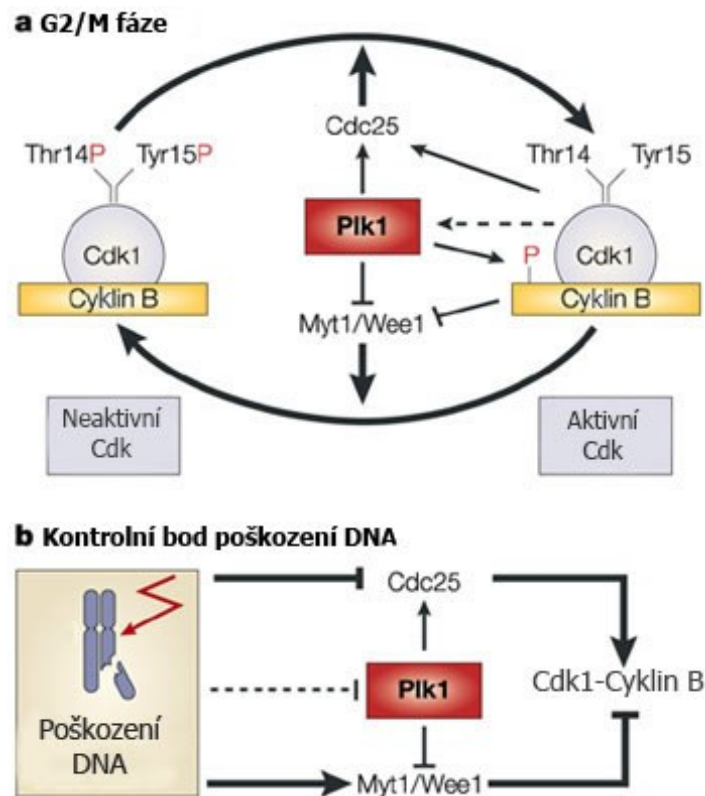
### 1.4.2 Regulace duplikace centrozomů

Centrozomy se musí před zahájením mitózy duplikovat a k duplikaci musí dojít právě jednou za každý buněčný cyklus. Důležitým faktorem pro duplikaci centrozomů je Cdk2 v komplexu s Cyklinem A (Meraldi et al., 1999) nebo Cyklinem E (Hinchcliffe et al., 1999), která fosforyluje Rb

protein (Akiyama et al., 1992), který dále aktivuje transkripční faktory z rodiny E2F (Meraldi et al., 1999), stejně jako v případě regulace G1/S přechodu.

### 1.4.3 Regulace G2/M přechodu

Vstup do mitózy je řízen aktivací komplexu Cyklin-dependentní kináza 1-Cyklin A (Cdk1-Cyklin A) a Cyklin-dependentní kináza 1-Cyklin B (Cdk1-Cyklin B) a jeho následným přesunem z cytoplazmy do jádra.



**Obr. 1 Regulace aktivity komplexu Cyklin-dependentní kináza 1-Cyklin B (Cdk1-Cyklin B).**

**a G2/M fáze:** Komplex Cdk1-Cyklin B je v důsledku inhibiční fosforylace kinázami Myt1/Wee1 na threoninu 14 (Thr14) a tyrosinu 15 (Tyr15) neaktivní. Po defosforylaci fosfatázou Cdc25 dojde k aktivaci komplexu a ten zpětně fosforyluje Cdc25 a Myt1/Wee1 a tím je aktivuje, respektive inhibuje. Plk1 přispívá k aktivaci komplexu Cdk1-Cyklin B fosforylací, která aktivuje Cdc25 a inhibuje Myt1/Wee1. Plk1 dále fosforyluje a aktivuje Cyklin B.

**b Kontrolní bod poškození DNA:** Při poškození DNA dojde k inhibici Plk1 a následkem toho k potlačení aktivity komplexu Cdk1-Cyklin B mechanismem popsáným v bodě a.

Převzato a upraveno z (Barr et al., 2004).

Protein kináza Wee1 (Wee1) inhibuje Cyklin-dependentní kinázu 1 (Cdk1 někdy označovanou Cdc2 či p34) fosforylací na tyrosinu 15 (Tyr15) a brání tím nástupu mitózy (McGowan and Russell, 1993). Membrane-associated tyrosine- and threonine- specific Cdc2-inhibitory kináza (Myt1) fosforyluje Cdk1 na threoninu 14 (Thr14) i Tyr15 (Mueller et al., 1995) a touto

posttranslační modifikací brání aktivaci komplexu a jeho translokaci do jádra (Wells et al., 1999), viz Obr. 1 a.

Cyklin-dependentní kináza 7 (Cdk7), která v komplexu s Cyklinem H slouží jako cyklin-dependentní kinázu aktivující kináza (CAK) (Fisher & Morgan, 1994; Larochelle et al., 1998), fosforyluje a aktivuje Cdk1 na threoninu 161 (Thr161) a tím umožňuje její vazbu s Cyklinem A nebo B (Ducommun et al., 1991). Polo-like kináza 1 (Plk1) fosforyluje Cyklin B na serinu 147 (Ser147) (Toyoshima-Morimoto et al., 2001) Obr. 1 a. Protein fosfatáza Cell division cycle 25 (Cdc25) je antagonistou k Wee1 a Myt1 a defosforyluje podjednotku Cdk1 komplexu Cdk1-Cyklin B na Thr14 a Tyr15, čímž se komplex aktivuje, viz Obr. 1 a (Strausfeld et al., 1991).

Nadřazeným regulátorem aktivace Cdk1-Cyklin B je Cdk1-Cyklin A, který inaktivuje Wee1 a tudíž nedochází k fosforylaci a inaktivaci Cdk1-Cyklin B. (Fung et al., 2007).

#### 1.4.4 Separace chromatid

Rozchodem chromatid k opačným pólům buňky začíná anafáze. Chromatidy jsou od počátku S fáze, kdy se začíná replikovat DNA, spojeny Kohezinovým komplexem (Michaelis et al., 1997). V profázi se neproteolytickou cestou rozruší komplex na ramenech chromozómů (Darwiche et al., 1999), ale je ponechán v oblasti centromery (Waizenegger et al., 2000). Na začátku anafáze dochází k proteolytickému štěpení centromerického Kohezinu proteázou Separáza (Uhlmann et al., 2000). Aby byla Separáza neaktivní až do anafáze nese inhibiční fosforylaci, která musí být zrušena pro aktivaci proteinu (Stemmann et al., 2001) a sdružuje se s proteinem Sekurinem, který brání přístupu substrátu k aktivnímu místu Separázy (Waizenegger et al., 2002). V anafázi dojde k proteolytické degradaci Sekurinu pomocí APC/C a aktivaci Separázy (Zou et al., 1999). V telofázi se Kohezin opět připojuje k chromatidám (Darwiche et al., 1999).

#### 1.4.5 Anafázi-podporující komplex/cyklozóm (APC/C)

Anafázi-podporující komplex/cyklozóm je svojí funkcí ubiquitin ligáza čili enzym, který na jiné proteiny postupně připojuje peptidy ubiquitinu, čímž je označí k degradaci pomocí 26S proteazomu (Sudakin et al., 1995). APC/C je aktivován vazbou proteinu Cell division cycle 20 (Cdc20) nebo Cdc20 homolog 1 (Cdh1) (Fang et al., 1998a). Specifita degradace proteinů závisí na APC/C komplexu a je dána přítomností konkrétní sekvence aminokyselin u substrátu, takzvaného destrukčního boxu neboli D-boxu (Sudakin et al., 1995), anebo KEN boxu pouze v případě, je-li aktivátorem Cdh1 (Pfleger and Kirschner, 2000).

Pro vazbu Cdc20 na APC/C, který tím aktivuje, je nutná jeho předchozí fosforylace, kterou zajišťuje Cdk1 a Plk1 (Golan et al., 2002). Naopak fosforylace Cdh1, která trvá od S fáze do konce

M fáze, je inhibiční a za těchto podmínek se neváže na APC/C a nemůže ho proto aktivovat (Kramer et al., 2000).

Tento komplex se účastní zahájení anafáze zprostředkováním degradace proteinu Sekurinu (Zou et al., 1999) a dále hraje významnou roli při výstupu buňky z mitózy inaktivací Cdk1-Cyklin B proteolýzou Cyklinu B (shrnutí v van Leuken et al., 2008).

## 2 Kontrolní body buněčného cyklu

Buněčný cyklus je velmi komplikovaný děj, proto musí být důsledně kontrolován.

Důležitým kontrolním bodem G1 fáze je restriční bod (R bod), ve kterém se určí, zda se buňka bude dále dělit, či setrvá v G1 fázi z důvodu nedostatku živin, nebo přejde do G0 fáze po obdržení signálu k diferenciaci v určitý buněčný typ. U nádorových buněk je restriční bod potlačen obdržáním signálu k dalšímu dělení bez ohledu na stav buňky a jejího okolí a buňka se začne nekontrolovatelně dělit.

Dojde-li v G1 fázi k poškození DNA, aktivuje se G1 kontrolní bod, který zabrání progresi do S fáze, aby se poškození opravilo dřív, než se DNA bude replikovat a dědit do dalších generací.

Poškození DNA se ale může objevit i v průběhu syntézy DNA, proto má buňka kontrolní mechanismus i v rámci S fáze.

Není-li DNA doreplikována, či došlo-li k jejímu poškození, G2/M kontrolní bod způsobí setrvání v G2 fázi.

Mitotický kontrolní bod neboli kontrolní bod připojení dělicího vřeténka (SAC = spindle assembly checkpoint) kontroluje správnost připojení dělicího vřeténka na chromatidy a v případě nalezení defektu buňka setrvává v tomto bodě, dokud není zjednána náprava.

Dojde-li k narušení funkce kontrolního bodu mutací, která způsobí sníženou nebo zvýšenou expresi, nadměrnou aktivitu či inaktivaci libovolného proteinu signální dráhy, může dojít k nádorovému bujení. Ve většině lidských nádorů bývá nefunkční restriční bod, naopak G2/M kontrolní bod je narušen zřídka (shrnutí v Molinari, 2000).

### 2.1 Restriční bod (R bod)

Hlavním činitelem restričního bodu je Rb protein. Do restričního bodu je Rb protein hypofosforylovaný a jeho aktivita inhibující růst buňky je zapnutá. Má-li buňka dost živin a podnětů k dělení, dojde v R bodě k hyperfosforylaci Rb proteinu a jeho inhibici. Buňka může pokračovat v cyklu přechodem z restričního bodu do S fáze (shrnutí v Zetterberg et al., 1995).



## 2.2 G1 kontrolní bod reagující na poškození DNA

Signální dráha reagující na DNA poškození v G1 fázi je závislá na proteinu p53. Protein p53 působí jako transkripční faktor genů, které fungují v dráhách závislých na p53 (Yu et al., 1999). Za normálního stavu je koncentrace p53 v buňce nízká díky krátkému poločasu života. Aktivita p53 je negativně regulována proteinem Mouse double minute 2 (Mdm2), který slouží jako jeho ubiquitin ligáza (Honda et al., 1997), ale zároveň úroveň transkripce Mdm2 závisí na p53 a jeho aktivitě regulované Mdm2, takže se jedná o smyčku zpětnovazebné autoregulace (Wu et al., 1993). Při DNA poškození se aktivuje kináza Ataxia telangiectasia mutated (ATM), která fosforyluje a aktivuje protein Checkpoint kináza 2 (Chk2) (Ahn et al., 2000), který následně fosforyluje p53 na serinu 20 (Ser20) a rozruší vazbu s Mdm2 (Chehab et al., 2000). Zároveň dojde k fosforylaci p53 na serinu 15 (Ser15) kinázou ATM (Canman et al., 1998) nebo Ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) (Lakin et al., 1999), která brání navázání dalšího Mdm2 a tím vzroste hladina p53 v buňce (Shieh et al., 1997).

Mezi proteiny transkribované po indukci p53 patří Inhibitor Cyklin-dependentní kinázy 1 (p21), původně pojmenovaný jako Waf1, někdy také označovaný Cip1, který potlačuje růst nádorových buněk (el-Deiry et al., 1993). Protein p21 se váže na komplexy Cdk4-Cyklin D, Cdk6-Cyklin D a Cdk2-Cyklin E. Pokud je navázána pouze jedna molekula p21, komplexy zůstávají aktivní. Vazba více molekul p21 však komplexy inhibuje a tím brání buňce v přechodu z G1 do S fáze (Harper et al., 1995). Je-li p21 inaktivován, pokračuje buňka buněčným cyklem i přes poškození DNA (Deng et al., 1995). Je-li naopak jeho exprese zvýšená, dochází k zastavení buňky v G1 fázi (Harper et al., 1995).

Protein p53 je mutován u mnoha typů nádorů, především solidního typu, s četností 0-60 %. U některých histologických subtypů dokonce s četností nad 80 % (shrnutí v Greenblatt et al., 1994).

## 2.3 S-fázový kontrolní bod

Tento kontrolní bod reaguje na poškození DNA, např. ozáření, nebo vyčerpání deoxyribonuklotidtrifosfátů (dNTP), např. aplikací hydroxyurey (HU) a používá dva mechanismy regulace. První spočívá v zabránění tvorby nových replikačních počátků a druhý zpomaluje postup replikační vidličky po vláknech DNA. První jmenovaná regulace je globální a postihuje všechny replikační počátky bez ohledu na místo výskytu DNA poškození. Druhá regulace může být globální i lokální a týkat se pouze míst s poškozením (shrnutí v Willis & Rhind, 2009).

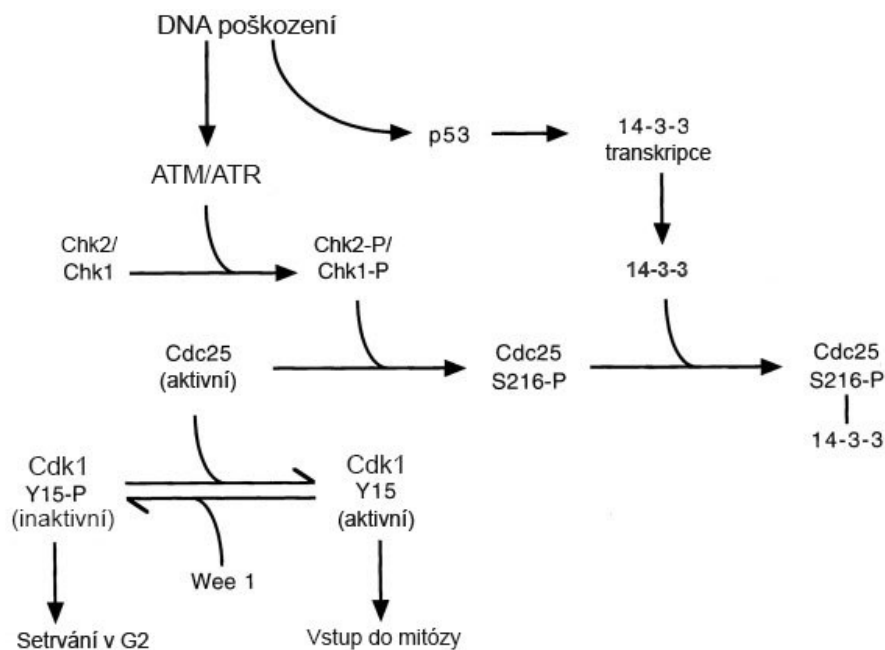
Zabránění tvorby replikačních počátků iniciuje komplex Double-strand break repair protein - DNA repair protein Rad50 - DNA repair protein Xrs2 (Mre11-Rad50-Xrs2), který lokalizuje

kinázu ATM do míst dvouvláknových zlomů na DNA. ATM aktivuje Chk2 kinázu a ta fosforyluje Cell division cycle 25A (Cdc25A) a řídí ji k degradaci. Tudíž Cdc25A nefosforyluje a neaktivuje komplex Cdk2-Cyklin E, který zprostředkovává nasednutí replikačního iniciačního proteinu Cell division cycle 45 (Cdc45) na replikační počátek (Falck et al., 2002).

ATR je lokalizována k poškozené replikační vidličce rozpoznáním jednořetězcové DNA, která vznikla při poškození. Substráty ATR jsou Checkpoint kináza 1 (Chk1), Rb protein a Replikační protein A, které pak regulují syntézu DNA (Liu et al., 2007).

## 2.4 G2/M kontrolní bod

Dojde-li v buňce k poškození DNA před nástupem mitózy, kontrolní mechanismus zabrání aktivaci komplexu Cdk1-Cyklin B. Nejdůležitějším faktem je udržení inhibiční fosforylace Cdk1 na Thr14 a Tyr15 (Jin et al., 1996). Toho je docíleno inaktivací fosfatázy Cdc25 fosforylací na serinu 216 (Ser216) kinázami Chk2 a Chk1 a vazbou s proteiny rodiny 14-3-3, znázorněno na Obr. 2 (Peng et al., 1997; Sanchez et al., 1997). Chk2 aktivuje fosforylace proteinem ATM (Chaturvedi et al., 1999) a Chk1 fosforylace proteinem ATR (Liu et al., 2000).



**Obr. 2 Model přenosu signálu kontrolního bodu po DNA poškození.** Při DNA poškození se aktivuje protein ATM/ATR, který fosforylací aktivuje Chk2/Chk1. Chk1 následně fosforyluje Cdc25 na serinu 216 (Ser216), čímž ho inaktivuje. DNA poškození zároveň aktivuje protein p53, který indukuje transkripci proteinů z rodiny 14-3-3 a které interagují s Cdc25 a tím pomáhají jeho inaktivaci. V levém dolním rohu je znázorněna role aktivující defosforylace Cdk1 fosfatázou Cdc25 při vstupu do mitózy a antagonistická kináza Wee1, která Cdk1 inaktivuje fosforylací na tyrosinu 15 (Tyr15). Převzato a upraveno z (Nurse, 1997).

Další úlohu sehrává potlačení transkripce Cdk1 a Cyklinu B proteinem p53 (Taylor et al., 1999). Protein p53 se účastní na aktivní eliminaci Cyklinu B z jádra díky jadernému exportnímu signálu (NES = nuclear export signal), který Cyklin B obsahuje (Toyoshima et al., 1998) a také vazbě na protein 14-3-3 sigma, jehož transkripce je indukována proteinem p53 (Hermeking et al., 1997) a který zadržuje Cyklin B v cytoplazmě (Chan et al., 1999b).

## 2.5 Kontrolní bod připojení dělicího vřeténka (SAC)

M kontrolní bod signalizuje do té doby, dokud je některý kinetochor nepřipojený k dělicímu vřeténku (Rieder et al., 1994) a není pod napětím sil (Li and Nicklas, 1995).

V profázi komplex sestávající se z kinázy Aurora B a z proteinu Inner centromere protein (INCENP) indukuje lokalizaci proteinu Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kináza Bub1 (Bub1) na kinetochory (Vigneron et al., 2004). Bub1 je důležitý pro následnou lokalizaci proteinů Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kináza Bub1 beta (BubR1), Mitotic checkpoint protein Bub3 (Bub3), Centromere-associated protein E (CENP-E), Mitotic spindle assembly checkpoint protein Mad1 (Mad1) a Mitotic spindle assembly checkpoint protein Mad2 (Mad2) (Johnson et al., 2004; Sharp-Baker & Chen, 2001).

BubR1 rozpoznává nepřipojený kinetochor pomocí molekulárního motoru CENP-E (Chan et al., 1999a). Mad1 interaguje s Mad2 a mění jeho konformaci (Luo et al., 2002). Mad2 se poté jako tetramer naváže na komplex APC-Cdc20, který zainhibuje, aby neštěpil Sekurin a buňka setrvá před anafází (Fang et al., 1998b). Následně byl objeven ještě účinnější inhibitor komplexu APC/C skládající se z komplexu proteinů BubR1-Bub3-Cdc20-Mad2 nazvaný komplex mitotického kontrolního bodu (MCC = mitotic checkpoint complex) (Sudakin et al., 2001). Faktor Cdc20 je kromě toho inaktivován fosforylací proteinem Bub1 (Tang et al., 2004).

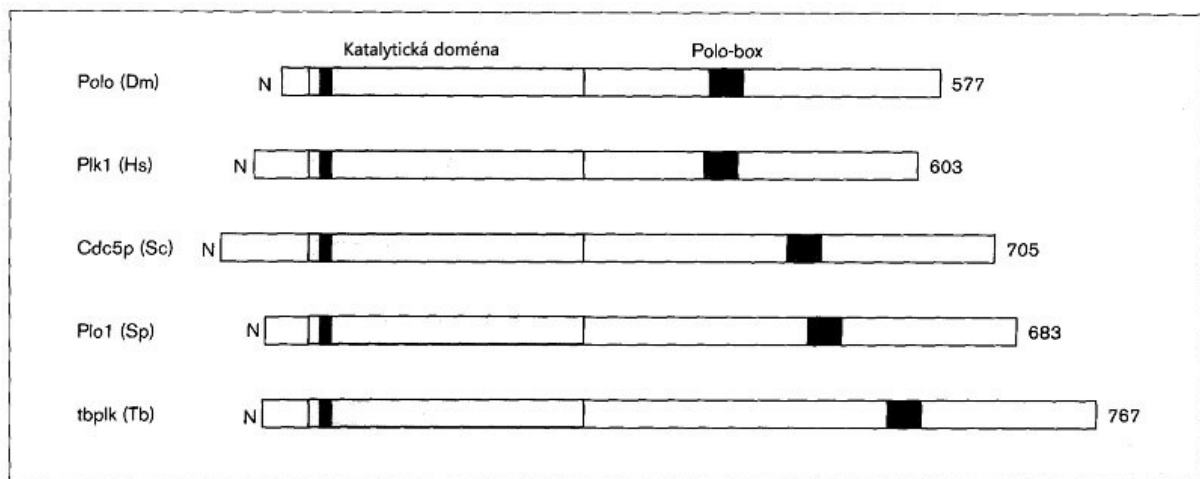
Cdk1 fosforyluje Bub1 a podjednotku INCENP komplexu Aurora B-INCENP. Bub1 a komplex Aurora B-INCENP následkem toho váží Polo-like kinázu 1 (Plk1) a lokalizují ji na kinetochory (Goto et al., 2006; Qi et al., 2006). Plk1 je zodpovědná za tvorbu 3F3/2 fosfoepitopu, který signalizuje kinetochor bez připojeného vřeténka a tudíž i bez napětí (Ahonen et al., 2005) a také fosforyluje podjednotky APC/C komplexu, který pak s větší afinitou váže Cdc20 a aktivuje se (Golan et al., 2002).

Podrobnější mechanismy fungování kontrolních bodů jdou nad rámec této práce, proto je zde nebudu více diskutovat.

## 3 Polo-like kinázy

### 3.1 Obecná charakteristika Polo-like kináz

Polo-like kinázy (Plk) jsou proteiny s kinázovou enzymatickou aktivitou. To znamená, že katalyzují přenos fosfátové skupiny na jiný protein a tím regulují jeho aktivitu nebo stabilitu nebo lokalizaci a jiné. Patří do rodiny serin/threoninových protein kináz, které přenáší fosfát na aminokyselinové zbytky serinu a threoninu. Ve většině případů bývají samy regulovány fosforylací nadřazenými kinázami nebo autofosforylací.



**Obr. 3 Sekvenční srovnání homologů z rodiny Polo-like kináz.** Polo (Dm = *Drosophila melanogaster*), Plk1 (Hs = *Homo sapiens*), Cdc5p (Sc = *Saccharomyces cerevisiae*), Plo1 (Sp = *Schizosaccharomyces pombe*), tbplk (Tb = *Trypanosoma brucei*). Převzato a upraveno z (Nigg, 1998).

Prvním pozorovaným proteinem z této rodiny byl protein polo u *Drosophila melanogaster*, jehož mutace způsobuje abnormality v mitóze (Sunkel and Glover, 1988) a poruchy cytokineze (Carmena et al., 1998) a podle něhož tato rodina proteinů dostala svůj název. V pučící kvasince *Saccharomyces cerevisiae* a dělící se kvasince *Schizosaccharomyces pombe*, byl dosud objeven pouze jeden homolog z rodiny Polo-like kináz a to Cell division cycle 5 (Cdc5) (Kitada et al., 1993), respektive Plo1 (Ohkura et al., 1995). Defekty způsobené jejich mutací odpovídají proteinu polo, avšak jsou zde drobné odchylky, které jsou způsobené evolučně vyvinutými odlišnými mechanismy dělení.

U obratlovců, jako je žába *Xenopus laevis*, již nacházíme více homologů s různými funkcemi a expresí v průběhu buněčného cyklu. Plx1 se dá přirovnat k proteinu *Drosophila* polo a ke kvasinkovým homologům Cdc5 a Plo1 (Kumagai and Dunphy, 1996). Dále se v buňkách exprimuje Plx2 a Plx3 (Duncan et al., 2001).

V současné době je známo pět lidských homologů proteinů Polo-like kináz: Plk1, Plk2, Plk3, Plk4 a Plk5. Nejprobádanějším homologem plnicím řadu funkcí v průběhu mitózy je Plk1. Plk2 a Plk4 mají hlavní úlohu v duplikaci centriol a Plk3 se účastní kontrolního bodu poškození DNA. Plk5 je exprimovaná v nervových a gliových buňkách a působí proti vzniku nádoru mozku, postrádá však kinázovou doménu a tedy i enzymatickou aktivitu (de Cárcer et al., 2011), proto se jí nebudu ve své práci detailněji zabývat. Sekvenční homologie mezi proteiny z rodiny Polo-like kináz je vysoká, jak ukazuje Obr. 3 a z té vyplývá i strukturní a funkční homologie.

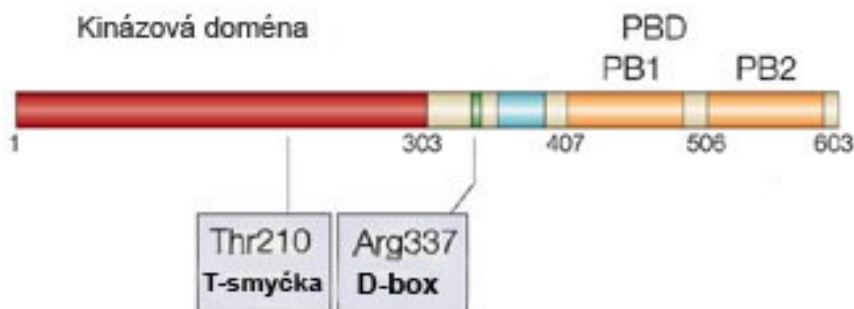
## 3.2 Polo-like kináza 1 (Plk1)

### 3.2.1 N-terminální doména

N-terminální doména, také zvaná katalytická, má enzymatickou úlohu. Váže protein a adenosintrifosfát (ATP) nebo guanosintrifosfát (GTP), ze kterého přenáší  $\gamma$ -fosfátovou skupinu na funkční hydroxylovou skupinu serinu nebo threoninu navázaného proteinu. Doménu lze strukturně členit na dvanáct menších subdomén, jejichž sekvenční motivy jsou mezi organismy velmi konzervovány (shrnuto v Hanks & Hunter, 1995).

### 3.2.2 T-smyčka

T-smyčka, někdy zvaná aktivační, protože její fosforylace je potřeba k plné aktivaci kinázy (shrnuto v Archambault & Glover, 2009). Zásadní aminokyselinou této oblasti, na které se fosforylace odehrává, je threonin 210 (Thr210), viz Obr. 4 (Jang et al., 2002a).



**Obr. 4 Schéma struktury Polo-like kinázy 1 (Plk1).** Kinázová doména obsahuje tzv. T-smyčku neboli aktivační smyčku, na které dochází na threoninu 210 (Thr210) k aktivační fosforylaci. Destrukční box (D-box) je sekvence řídící Plk1 k destrukci proteazomem. Polo-box doména (PBD) obsahuje Polo-box 1 (PB1) a Polo-box 2 (PB2) sekvence. Převzato a upraveno z (Barr et al., 2004).

### 3.2.3 D-box

Destrukční box neboli D-box znázorněný na Obr. 4 je sekvence aminokyselin rozpoznávaná APC/C komplexem vázajícím Cdh1 aktivátor, který Plk1 označí polyubiquitinem a určí k destrukci proteazomem (Lindon and Pines, 2004).

### 3.2.4 C-terminální doména

C-terminální doména neboli Polo-box doména (PBD) obsahuje dvě strukturně homologní sekvence zvané jako Polo-boxy, viz Obr. 4 (Elia et al., 2003a). Tato doména hraje důležitou roli v lokalizaci Plk1 a pro správnou funkci jsou důležité oba Polo-boxy (Seong et al., 2002). Je to fosfopeptid-vazebná doména vázající fosfoserin (pSer) nebo fosfothreonin (pThr). Vazba fosfopeptidu umožňuje Plk1 specificky lokalizovat v buňce (Elia et al., 2003b). Tryptofan 414 (Trp414) je nejvýznamnější aminokyselinou C-terminální domény. Mutace v této aminokyselině nebo delece celé C-terminální domény způsobuje neschopnost Plk1 lokalizovat na správné místo a plnit tak svoji funkci (Lee et al., 1998).

Ze získaných experimentálních dat vyplývá, že C-terminální doména se také účastní regulace aktivity Plk1 vazbou na kinázovou doménu, čímž její aktivitu inhibuje. Při expresi mutantní Plk1 s deletovanou C-terminální doménou v savčích buňkách byla aktivita Plk1 několikanásobně vyšší, než u přirozeně se vyskytující „wild type“ (wt-Plk). Provedený dvouhybridový systém interakci mezi N- a C-terminální doménou potvrdil (Jang et al., 2002b).

Po fosforylaci Thr210 v oblasti T-smyčky se vazba mezi oběma doménami rozruší a kinázová doména se stává aktivní. Při substituci threoninu za kyselinu asparagovou (T210D), která imituje fosforylaci, nedochází k vazbě C-terminální domény na kinázovou doménu a aktivita této mutantní kinázy je shodná s C-deletovanou kinázou. (Jang et al., 2002b)

### 3.2.5 Exprese a aktivita Plk1

Gen pro lidskou Plk1 je lokalizován na chromozómu 16p na lokusu 11.2-13.1. Otevřený čtecí rámec kóduje oblast dlouhou 603 aminokyselin, ze které se skládá protein o velikosti 68 254 daltonů. K expresi tohoto genu dochází v aktivně se dělících buňkách (Golsteyn et al., 1994). Je-li exprese Plk1 uměle umlčena, nedochází k proliferaci buněk, což svědčí o její nezanedbatelné roli v buněčném dělení (van Vugt et al., 2004a). Hladina Plk1 v buňce je nejvyšší na začátku mitózy, setrvává 30 minut a po jedné hodině s přechodem buňky do G1 fáze klesá množství proteinu na minimum. V průběhu S fáze se exprese postupně zvyšuje až v G2/M přechodu kulminuje (Golsteyn et al., 1994). Kinázová aktivita proteinu koreluje s jeho expresí. Maximální je v M fázi, avšak naměřené hodnoty aktivity pro mitotické buňky byly 4-6krát větší, než by byly pro stejné množství interfázních buněk (Golsteyn et al., 1995). Tento značný nárůst aktivity je dán regulací na posttranslační úrovni (Golsteyn et al., 1995), konkrétně pomocí fosforylace (Mundt et al., 1997).

Nejvýznamnějším fosforylačním místem sloužícím k aktivaci Plk1 během mitózy je threonin 210 (Thr210). Před vstupem do mitózy dojde k fosforylaci Thr210 kinázou Aurora A, která je

aktivována kofaktorem Bora (Macůrek et al., 2008). Při substituci threoninu za kyselinu asparagovou (T210D), která imituje fosforylaci, se aktivita Plk1 zvýšila (Jang et al., 2002a).

Pro autofosforylaci jsou důležité serinové zbytky, avšak autofosforylace není dějem účastnícím se aktivace Plk1 v průběhu mitózy (Jang et al., 2002a).

### 3.2.6 Lokalizace Plk1 v buňce

Plk1 se účastní v průběhu mitózy mnoha procesů a tomu odpovídá i její lokalizace v buňce. Od profáze do metafáze se nachází na centrozomech (Golsteyn et al., 1995). V anafázi se koncentruje v oblasti ekvatoriální roviny, kde dochází k překryvu dělicích vřetének z opačných pólů (Golsteyn et al., 1995) a na konci telofáze se hromadí v kontraktálním prstenci (Arnaud et al., 1998). Po celou dobu mitózy od profáze do telofáze byla zjištěna přítomnost Plk1 na kinetochorech chromozómů (Arnaud et al., 1998).

### 3.2.7 Role Plk1 v průběhu mitózy

#### 3.2.7.1 Vstup do mitózy

Synchronizací a následným uvolněním Plk1-umlčených buněk z G1/S rozhraní bylo zjištěno, že Plk1 se neúčastní normálního vstupu do mitózy, neboť buňky při vstupu do mitózy vykazovaly shodnou kinetiku s kontrolní linií a poruchy buněčného dělení souvisely až s následným průběhem mitózy (van Vugt et al., 2004a), nebo byl nástup mitózy pouze zpožděn (Sumara et al., 2004).

Plk1 ale sehrává významnou úlohu při opětovném vstupu buňky do mitózy z G2 kontrolního bodu po opravení DNA poškození (van Vugt et al., 2004b). Plk1 fosforyluje kinázu Wee1 na serinu 53 (Ser53), čímž způsobí degradaci Wee1 (Watanabe et al., 2004) a obnovení buněčného cyklu (van Vugt et al., 2004b) a také fosforyluje a inaktivuje Myt1 (Nakajima et al., 2003), respektive aktivuje Cdc25, jak ukazuje Obr. 1 a (Toyoshima-Morimoto et al., 2002). Dojde-li v průběhu G2 fáze k nesprávné kondenzaci chromozómů nebo nedoreplikování a jinému poškození DNA, spustí se Ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR)-signální dráha, která indukuje zastavení dělení buňky v G2 kontrolním bodě (Deming et al., 2001). Při DNA poškození je inhibována aktivace Plk1 a nedojde ke spuštění mitózy, což znázorňuje Obr. 1 b. Mechanismus kontroly poškození DNA je aktivní i v průběhu mitózy a při poškození DNA aktivitu Plk1 přerušuje (Smits et al., 2000).

#### 3.2.7.2 Centrozomová maturace a tvorba dělicího vřeténka

Plk1 je potřebná pro správnou maturaci centrozómů a pro asociaci  $\gamma$ -tubulinu, jakožto nukleárního jádra dělicího vřeténka. Byla-li její funkce blokována mikroinjekcí protilátky proti Plk1 do HeLa buněk, centrozomy se zduplikovaly, ale nebyly schopné dosáhnout funkční

velikosti a separovat se k opačným pólům buňky. V důsledku toho nedocházelo ke správnému rozchodu chromozómů a následnému dokončení mitózy a hromadily se buňky s neseparovanými chromozómy v metafázní destičce, s mikrojaderným či multijaderným fenotypem nebo jinými abnormalitami v separaci DNA (Lane and Nigg, 1996).

Tuto skutečnost potvrdily i experimenty s buňkami transfekovanými konstrukty pro RNA interference (RNAi) za využití mikroskopovací techniky. Do buňky byl vnesen konstrukt se sekvencí komplementární k mRNA proteinu, takže docházelo k párování obou RNA a vnesená RNA štěpila mRNA Plk1, takže nedocházelo k translaci proteinu. Tím bylo docíleno toho, že protein v buňce nebyl přítomný. K duplikaci centrozomů docházelo i za nepřítomnosti Plk1, avšak nedošlo k jejich oddálení na opačné póly buňky a nebyla pozorována funkce centrozomů jakožto nukleačního centra pro mikrotubuly dělicího vřeténka. Buňky tudíž nebyly schopné sestavit funkční aparát pro separaci chromozómů a zastavily své dělení v prometafázi (Sumara et al., 2004; van Vugt et al., 2004a).

Bylo zjištěno, že v buňkách bez exprimované Plk1 vlákna dělicího vřeténka polymerují a dokonce i interagují s kinetochory, ale jsou monopolárního charakteru, jejich orientace je neuspořádaná a vazba ke kinetochorům je nestabilní (Sumara et al., 2004; van Vugt et al., 2004a).

### 3.2.7.3 Připojení dělicího vřeténka ke kinetochorům

Nedostatek Plk1 způsobuje neschopnost uskutečnění správného napětí na kinetochorech, která je dána vytvořením nefunkčního (např. monopolárního) dělicího vřeténka a buňka tedy nemůže opustit kontrolní bod připojení dělicího vřeténka ke kinetochorům (Sumara et al., 2004; van Vugt et al., 2004a). Protein Survivin se účastní signalizace nedostatku napětí na kinetochorech v kontrolním bodu připojení dělicího vřeténka (Lens et al., 2003). Při potlačení kontroly napětí na kinetochorech umlčením exprese proteinu Survivin, došlo k výstupu buňky z mitózy, což předpokládá jinak správný průběh ostatních dějů v buňce (van Vugt et al., 2004a).

### 3.2.7.4 Cytokineze

Metody chemické genetiky využívající specifické inhibitory proteinů, které zablokují protein v buňce téměř okamžitě, přinesly možnost objasnit roli Plk1 při cytokinezi. Tato metoda umožňuje aplikovat inhibitor a blokovat protein až v pozdních fázích mitózy a tím se vyhnout defektům způsobeným v dřívějších fázích, které naruší průchod mitózou. Předchozí analýzy funkcí Plk1 v mitóze pomocí RNAi toto neumožňovaly. Při blokaci Plk1 inhibitorem nedochází k lokalizaci proteinů potřebných pro cytokinezi v oblasti překryvu dělicích vřetének z opačných pólů a tedy ani k tvorbě kontraktilního prstence (Burkard et al., 2009).



Plk1 lokalizuje v oblasti překryvu dělicích vřetének z opačných pólů a váže Rac GTPázu-aktivující protein 1 (RhoGAP Cyk-4), který fosforyluje. Tato fosforylace je zodpovědná za vazbu a aktivaci GDP-GTP výměnného faktoru Epithelial cell-transforming sequence 2 oncogene (RhoGEF Ect2) (Burkard et al., 2009).

Pro polymeraci aktinu a aktivaci myosinu II kontraktálního kruhu je potřeba GTP fosfohydroláza (GTPáza) z rodiny Rho, Transformující protein RhoA (RhoA). Váže-li GTPáza guanosintrifosfát (GTP), je aktivní, váže-li guanosindifosfát (GDP), je neaktivní. K výměně GDP za GTP slouží GDP-GTP výměnný faktor Ect2. Hydrolýze GTP na GDP pomáhá Cyk-4 (Piekny et al., 2005).

### 3.2.7.5 Výstup z mitózy

V době relokalizace Plk1 z kinetochorů do oblasti kontraktálního kruhu dochází ke snížení hladiny proteinu v buňce proteolytickou degradací komplexem APC/C. Tato degradace umožňuje výstup z mitózy a trvá do započetí G1 fáze. Sekvencí důležitou pro tuto degradaci je motiv RxxL zvaný jako destrukční box (D-box). Substituce argininu či leucinu za alanin způsobila setrvání v anafázi (Lindon and Pines, 2004).

Plk1 se účastní výstupu z mitózy ještě nepřímou cestou, kdy po aktivaci fosforylační Cdk1-Cyklin B komplexem má schopnost fosforylovat tři podjednotky APC/C komplexu a tím ho aktivovat k degradaci Cyklinu B, která je důležitá k výstupu z mitózy (Kotani et al., 1998). Je-li v průběhu mitózy aktivován kontrolní bod poškození DNA, dojde k inaktivaci Plk1 a v důsledku toho k inhibici degradace Cyklinu B, která je závislá na funkční Plk1 a nezbytná k opuštění M fáze (Smits et al., 2000).

### 3.2.8 Plk1 v nádorech

Plk1 je v porovnání s normálními buňkami nadměrně exprimována v některých nádorech, například v rakovině prsu, vaječníku, dělohy, kůže, žaludku a jiných. Její hladina exprese odpovídá klinicko-patologickému obrazu nádoru (stádiu vývoje, metastázím a době přežití pacientů) a proto by mohla sloužit jako ukazatel toho, s jakou pravděpodobností je nádor léčitelný (shrnutí v Weiß & Efferth, 2012). Pokusy s inhibicí Plk1 pomocí RNAi u meduloblastomů vedly k nadějným výsledkům. Snížila se klonogenní schopnost nádorových buněk, schopnost množovat se a naopak došlo k nárůstu apoptózy. Podobné výsledky přinesly i experimenty s inhibítorem Plk1 BI 2536, který navíc způsobil, že buňky se staly citlivými na ionizující záření (Harris et al., 2012). Byli již zaznamenány i první úspěchy léčby akutní myeloidní leukémie pomocí inhibitoru Plk1 NMS-P937 (Casolaro et al., 2013).

### 3.3 Polo-like kináza 2 (Plk2)

Plk2 také nazývaná jako Serum-inducible kináza (Snk) je 77 811 daltonů velký protein (Simmons et al., 1992) exprimovaný časně v G1 fázi s poločasem života 15 minut (Ma et al., 2003a). Buňky postrádající Plk2 mají zpožděný přechod z G1 do S fáze. To naznačuje její úloze v buněčném dělení (Ma et al., 2003b). Polo-box doména proteinu řídí lokalizaci Plk2 na MTOC (Ma et al., 2003a). V G1 fázi Plk2 interaguje s mateřskou centriolou. Od začátku S fáze, kdy dochází k syntéze dceřiné centrioly, je lokalizována na obou centriolách (Cizmecioglu et al., 2008). Plk2 reguluje duplikaci centrozomů (Warnke et al., 2004), která je závislá na funkci Plk4 (Cizmecioglu et al., 2008).

Plk2 dále sehrává roli v embryonálním vývoji kostry u myší. Myší embrya bez funkční Plk2 byla menší a měla opožděný vývoj kostry (Ma et al., 2003b). Také má úlohu v plasticitě synaptických spojů přeměnou morfologie dendritických zakončení (Pak and Sheng, 2003).

### 3.4 Polo-like kináza 3 (Plk3)

Plk3 jiným názvem Proliferation-related kináza (Prk), u myší nazývaná Fibroblast growth factor-inducible kináza (Fnk) (Donohue et al., 1995), je přibližně 67 800 daltonů velká kináza, která se v buňce vyskytuje jen v jedné kopii a má vliv na pokrok buněčným cyklem (Li et al., 1996). Exprese proteinu je indukovatelná cytokiny nebo růstovými faktory (Donohue et al., 1995). Množství proteinu je v průběhu buněčného cyklu regulováno a maxima dosahuje v G1 fázi (Zimmerman and Erikson, 2007). Při vstupu buňky do mitózy je Plk3 fosforylována a na konci je zpět defosforylována (Chase et al., 1998). Role fosforylace ale nebyla dosud objasněna.

Názory na aktivitu kinázy v průběhu buněčného cyklu se různí. Jeden zdroj uvádí, že fosforylace při vstupu buňky do mitózy zvýší aktivitu Plk3 a ta po defosforylaci opět klesne (Chase et al., 1998). Jiný zdroj říká, že kinázová aktivita je v mitóze nejmenší a roste s pokračováním cyklu do pozdní S fáze až G2 fáze, kde je nejvyšší (Ouyang et al., 1997), což koreluje s výsledky naměřené hladiny proteinu v průběhu cyklu (Zimmerman and Erikson, 2007).

Publikované výsledky o lokalizaci Plk3 jsou také různorodé. Plk3 byla pozorována na centrozomech, dělicím vřeténku, pólech dělicího vřeténka a kontraktilním kruhu (Wang et al., 2002), na Golgiho aparátu v interfázi i v mitóze po jeho rozpadu, kterého je zřejmě příčinou (Ruan et al., 2004), na cytoplazmatické membráně, kde se účastní regulace aktinového cytoskeletu (Holtrich et al., 2000) a také v jadérku (Zimmerman and Erikson, 2007).

Funkce Plk3 je potřeba pro expresi Cyklinu E a přechodu z G1 fáze do S fáze (Zimmerman and Erikson, 2007). V reakci na DNA poškození je Plk3 fosforylována kinázou ATM a dále fosforyluje p53 a Chk2, k jehož plné aktivaci přispívá, kteří se účastní odpovědi na DNA poškození (Bahassi

et al., 2002). V některých typech nádorů se zdá být regulace Plk3 snižena (Li et al., 1996). Některá literatura uvádí, že Plk3 působí jako potlačovatel nádorů snižováním hladiny Hypoxia-inducible factor-1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ), který je exprimován v buňkách, které přežívají v podmínkách s nízkou hladinou kyslíku (většinou jde o nádorové buňky) (Yang et al., 2008). Jiný zdroj říká, že Plk3 fosforyluje Cdc25 fosfatázu a reguluje její stabilitu v souvislosti s odpovědí na DNA poškození, ale myši s absencí na Plk3 nevykazovaly zvýšenou tvorbu nádorů (Myer et al., 2011).

### 3.5 Polo-like kináza 4 (Plk4)

Plk4 dostala původně název Snk/Plk akin kináza (Sak) (Fode et al., 1994). Na rozdíl od předešlých Polo-like kináz její Polo-box doména obsahuje pouze jeden Polo-box motiv a tvoří homodimery (Leung et al., 2002). Plk4 lokalizuje v jádru v G2 fázi, na centrozomech časně v M fázi, na kontraktilním kruhu v telofázi a v mezijaderném prostoru v interfázi (Hudson et al., 2001). Její nezbytná úloha je v duplikaci centriol ve spolupráci s Cdk2, CP110, SAS4, SAS6, Cep135 a  $\gamma$ -tubulinem (Habedanck et al., 2005). Když není v buňce funkční Plk4, nedochází k jejich duplikaci (Bettencourt-Dias et al., 2005) a naopak při nadměrné expresi proteinu dochází k množování dceřiných centriol kolem mateřské centrioly (Kleylein-Sohn et al., 2007). Autofosforylace na serinu 305 (Ser305) kinázu aktivuje, což ovlivňuje duplikaci centriol a také je tím určena k degradaci proteazomem (Sillibourne et al., 2010).

# Závěr

Regulace buněčného cyklu a jeho kontrolní body jsou nepostradatelné pro přežití a správné dělení buňky. Významnou úlohu v něm sehrávají proteiny z rodiny Polo-like kináz. V této práci jsem stručně shrnula regulaci buněčného cyklu a jeho kontrolní body, ve kterých hrají Polo-like kinázy roli. V hlavní části jsem shrnula dosavadní informace o struktuře a funkcích Polo-like kináz v průběhu buněčného cyklu se zaměřením na lidské homology a hlavní důraz byl kladen na nejlépe prozkoumanou Plk1.

Signální dráhy G1/S kontrolního bodu reagujícího na poškození DNA jsou nejvíce známé a sdílí společné molekulární rysy s G2/M kontrolním bodem. Kontrolní bod připojení dělicího vřeténka (SAC) je zcela odlišný, ne méně důležitý, mechanismus, protože nesprávný rozchod chromatid do dceřiných buněk může vést ke genomové nevyváženosti, mutacím a potažmo nádorům.

Role Polo-like kináz je v buněčném cyklu nepostradatelná. Plk1 má úlohu v mitóze. Účastní se regulace vstupu do mitózy po přerušeném buněčném dělení po poškození DNA, maturace centrozomů a tvorby dělicího vřeténka, připojení vřeténka ke kinetochorům, cytokineze a výstupu z mitózy. Objev Plk1 jako potenciálního účastníka při vzniku nádorů na sebe upoutal velkou pozornost vzhledem k možnosti zacílení léčby rakoviny na funkci Plk1 pomocí inhibitorů. Ty ale musí být dostatečně specifické, aby nereagovaly s jinými proteiny z rodiny Polo-like kináz. Zda bude možné vyvinout účinnou léčbu, vzhledem k velké konzervovanosti mezi proteiny z rodiny Polo-like kináz, zatím zůstává předmětem současného a budoucího výzkumu. Nutno však podotknout, že již byly v léčbě zaznamenány první úspěchy.

Plk2 řídí duplikaci centrozomů, embryonální vývoj kostry a plasticitu synapsí.

Plk3 se zřejmě účastní rozpadu Golgiho aparátu, regulace aktinového cytoskeletu, exprese Cyklinu E, přechodu G1/S fází, odpovědi na DNA poškození a možná je potlačovatelem nádorů. Uvedené studie popisující lokalizaci Plk3 se spoléhají především na imunofluorescenční mikroskopii za využití protilátek, jejichž specifita nebyla vždy spolehlivě prokázána. Pro objasnění buněčné lokalizace Plk3 jsou tedy potřebné další studie.

Plk4 stejně jako Plk2 má funkci v duplikaci centrozomů a jako jediný homolog Polo-like kináz na C-terminálním konci obsahuje pouze jeden Polo-box.

V budoucnu je potřeba lépe objasnit funkce zbylých proteinů z rodiny Polo-like kináz vzhledem k velké konzervovanosti a potenciální možnosti na účasti rakoviny, ať už jako „aktivátoři“, stejně jako Plk1, nebo jako „potlačovatelé“, možná jako Plk3.

# Literatura

- Ahn, J.Y., Schwarz, J.K., Piwnica-Worms, H., and Canman, C.E. (2000). Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res.* *60*, 5934–5936.
- Ahonen, L.J., Kallio, M.J., Daum, J.R., Bolton, M., Manke, I.A., Yaffe, M.B., Stukenberg, P.T., and Gorbsky, G.J. (2005). Polo-like kinase 1 creates the tension-sensing 3F3/2 phosphoepitope and modulates the association of spindle-checkpoint proteins at kinetochores. *Curr. Biol.* *15*, 1078–1089.
- Akiyama, T., Ohuchi, T., Sumida, S., Matsumoto, K., and Toyoshima, K. (1992). Phosphorylation of the retinoblastoma protein by cdk2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 7900–7904.
- Archambault, V., and Glover, D.M. (2009). Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 265–275.
- Arnaud, L., Pines, J., and Nigg, E.A. (1998). GFP tagging reveals human Polo-like kinase 1 at the kinetochore/centromere region of mitotic chromosomes. *Chromosoma* *107*, 424–429.
- Bahassi, E.M., Conn, C.W., Myer, D.L., Hennigan, R.F., McGowan, C.H., Sanchez, Y., and Stambrook, P.J. (2002). Mammalian Polo-like kinase 3 (Plk3) is a multifunctional protein involved in stress response pathways. *Oncogene* *21*, 6633–6640.
- Barr, F. a, Silljé, H.H.W., and Nigg, E. a (2004). Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 429–440.
- Bettencourt-Dias, M., Rodrigues-Martins, A., Carpenter, L., Riparbelli, M., Lehmann, L., Gatt, M.K., Carmo, N., Balloux, F., Callaini, G., and Glover, D.M. (2005). SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. *Curr. Biol.* *15*, 2199–2207.
- Burkard, M.E., Maciejowski, J., Rodriguez-Bravo, V., Repka, M., Lowery, D.M., Clauser, K.R., Zhang, C., Shokat, K.M., Carr, S. a, Yaffe, M.B., et al. (2009). Plk1 self-organization and priming phosphorylation of HsCYK-4 at the spindle midzone regulate the onset of division in human cells. *PLoS Biol.* *7*, 1–16.
- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., and Siliciano, J.D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* *281*, 1677–1679.
- De Cárcer, G., Escobar, B., Higuero, A.M., García, L., Ansón, A., Pérez, G., Mollejo, M., Manning, G., Meléndez, B., Abad-Rodríguez, J., et al. (2011). Plk5, a polo box domain-only protein with specific roles in neuron differentiation and glioblastoma suppression. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 1225–1239.
- Carmena, M., Riparbelli, M.G., Ministrini, G., Tavares, A.M., Adams, R., Callaini, G., and Glover, D.M. (1998). *Drosophila* polo kinase is required for cytokinesis. *J. Cell Biol.* *143*, 659–671.
- Casolaro, A., Golay, J., Albanese, C., Ceruti, R., Patton, V., Cribioli, S., Pezzoni, A., Losa, M., Texido, G., Giussani, U., et al. (2013). The Polo-Like Kinase 1 (PLK1) inhibitor NMS-P937 is effective in a new model of disseminated primary CD56+ acute monoblastic leukaemia. *PLoS One* *8*, 1–11.

- Cizmecioglu, O., Warnke, S., Arnold, M., Duensing, S., and Hoffmann, I. (2008). Plk2 regulated centriole duplication is dependent on its localization to the centrioles and a functional polo-box domain. *Cell Cycle* 7, 3548–3555.
- Darwiche, N., Freeman, L.A., and Strunnikov, A. (1999). Characterization of the components of the putative mammalian sister chromatid cohesion complex. *Gene* 233, 39–47.
- DeGregori, J., Kowalik, T., and Nevins, J.R. (1995). Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4215–4224.
- Deming, P.B., Cistulli, C.A., Zhao, H., Graves, P.R., Piwnica-Worms, H., Paules, R.S., Downes, C.S., and Kaufmann, W.K. (2001). The human decatenation checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12044–12049.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., and Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675–684.
- Donohue, P.J., Alberts, G.F., Guo, Y., and Winkles, J.A. (1995). Identification by targeted differential display of an immediate early gene encoding a putative serine/threonine kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 10351–10357.
- Ducommun, B., Brambilla, P., Félix, M.A., Franza, B.R., Karsenti, E., and Draetta, G. (1991). cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin. *EMBO J.* 10, 3311–3319.
- Duncan, P.I., Pollet, N., Niehrs, C., and Nigg, E.A. (2001). Cloning and characterization of Plx2 and Plx3, two additional Polo-like kinases from *Xenopus laevis*. *Exp. Cell Res.* 270, 78–87.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817–825.
- Elia, A.E.H., Rellos, P., Haire, L.F., Chao, J.W., Ivins, F.J., Hoepker, K., Mohammad, D., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., and Yaffe, M.B. (2003a). The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* 115, 83–95.
- Elia, A.E.H., Cantley, L.C., and Yaffe, M.B. (2003b). Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* 299, 1228–1231.
- Falck, J., Petrini, J.H.J., Williams, B.R., Lukas, J., and Bartek, J. (2002). The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat. Genet.* 30, 290–294.
- Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M.W. (1998a). Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol. Cell* 2, 163–171.
- Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M.W. (1998b). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev.* 12, 1871–1883.
- Fisher, R.P., and Morgan, D.O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78, 713–724.

- Fode, C., Motro, B., Yousefi, S., Heffernan, M., and Dennis, J.W. (1994). Sak, a murine protein-serine/threonine kinase that is related to the *Drosophila* polo kinase and involved in cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 6388–6392.
- Fung, T.K., Ma, H.T., and Poon, R.Y.C. (2007). Specialized roles of the two mitotic cyclins in somatic cells: cyclin A as an activator of M phase-promoting factor. *Mol. Biol. Cell* *18*, 1861–1873.
- Golan, A., Yudkovsky, Y., and Hershko, A. (2002). The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J. Biol. Chem.* *277*, 15552–15557.
- Golsteyn, R.M., Schultz, S.J., Bartek, J., Ziemiecki, A., Ried, T., and Nigg, E.A. (1994). Cell cycle analysis and chromosomal localization of human Plk1, a putative homologue of the mitotic kinases *Drosophila* polo and *Saccharomyces cerevisiae* Cdc5. *J. Cell Sci.* *107*, 1509–1517.
- Golsteyn, R.M., Mundt, K.E., Fry, A.M., and Nigg, E.A. (1995). Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *J. Cell Biol.* *129*, 1617–1628.
- Goto, H., Kiyono, T., Tomono, Y., Kawajiri, A., Urano, T., Furukawa, K., Nigg, E.A., and Inagaki, M. (2006). Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition. *Nat. Cell Biol.* *8*, 180–187.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., and Harris, C.C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* *54*, 4855–4878.
- Habedanck, R., Stierhof, Y.-D., Wilkinson, C.J., and Nigg, E.A. (2005). The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nat. Cell Biol.* *7*, 1140–1146.
- Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* *9*, 576–596.
- Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., and Swindell, E. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell* *6*, 387–400.
- Harris, P.S., Venkataraman, S., Alimova, I., Birks, D.K., Donson, A.M., Knipstein, J., Dubuc, A., Taylor, M.D., Handler, M.H., Foreman, N.K., et al. (2012). Polo-like kinase 1 (PLK1) inhibition suppresses cell growth and enhances radiation sensitivity in medulloblastoma cells. *BMC Cancer* *12*, 80–93.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell* *1*, 3–11.
- Hinchcliffe, E.H., Li, C., Thompson, E.A., Maller, J.L., and Sluder, G. (1999). Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science* *283*, 851–854.
- Holtrich, U., Wolf, G., Yuan, J., Bereiter-Hahn, J., Karn, T., Weiler, M., Kauselmann, G., Rehli, M., Andreesen, R., Kaufmann, M., et al. (2000). Adhesion induced expression of the serine/threonine kinase Fnk in human macrophages. *Oncogene* *19*, 4832–4839.

- Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* *420*, 25–27.
- Hudson, J.W., Kozarova, A., Cheung, P., Macmillan, J.C., Swallow, C.J., Cross, J.C., and Dennis, J.W. (2001). Late mitotic failure in mice lacking Sak, a polo-like kinase. *Curr. Biol.* *11*, 441–446.
- Chan, G.K., Jablonski, S.A., Sudakin, V., Hittle, J.C., and Yen, T.J. (1999a). Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J. Cell Biol.* *146*, 941–954.
- Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1999b). 14-3-3 Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* *401*, 616–620.
- Chase, D., Feng, Y., Hanshew, B., Winkles, J.A., Longo, D.L., and Ferris, D.K. (1998). Expression and phosphorylation of fibroblast-growth-factor-inducible kinase (Fnk) during cell-cycle progression. *Biochem. J.* *333*, 655–660.
- Chaturvedi, P., Eng, W.K., Zhu, Y., Mattern, M.R., Mishra, R., Hurle, M.R., Zhang, X., Annan, R.S., Lu, Q., Faucette, L.F., et al. (1999). Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene* *18*, 4047–4054.
- Chehab, N.H., Malikzay, A., Appel, M., and Halazonetis, T.D. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev.* *14*, 278–288.
- Jang, Y.-J., Ma, S., Terada, Y., and Erikson, R.L. (2002a). Phosphorylation of threonine 210 and the role of serine 137 in the regulation of mammalian polo-like kinase. *J. Biol. Chem.* *277*, 44115–44120.
- Jang, Y.-J., Lin, C.-Y., Ma, S., and Erikson, R.L. (2002b). Functional studies on the role of the C-terminal domain of mammalian polo-like kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 1984–1989.
- Jin, P., Gu, Y., and Morgan, D.O. (1996). Role of inhibitory CDC2 phosphorylation in radiation-induced G2 arrest in human cells. *J. Cell Biol.* *134*, 963–970.
- Johnson, V.L., Scott, M.I.F., Holt, S. V, Hussein, D., and Taylor, S.S. (2004). Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. *J. Cell Sci.* *117*, 1577–1589.
- Kitada, K., Johnson, A.L., Johnston, L.H., and Sugino, A. (1993). A multicopy suppressor gene of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cell cycle mutant gene *dbf4* encodes a protein kinase and is identified as CDC5. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 4445–4457.
- Kleylein-Sohn, J., Westendorf, J., Le Clech, M., Habedanck, R., Stierhof, Y.-D., and Nigg, E.A. (2007). Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Dev. Cell* *13*, 190–202.
- Kotani, S., Tugendreich, S., Fujii, M., Jorgensen, P.M., Watanabe, N., Hoog, C., Hieter, P., and Todokoro, K. (1998). PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol. Cell* *1*, 371–380.
- Kramer, E.R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A. V, Mann, M., and Peters, J.M. (2000). Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol. Biol. Cell* *11*, 1555–1569.
- Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (1996). Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science* *273*, 1377–1380.



- Lakin, N.D., Hann, B.C., and Jackson, S.P. (1999). The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene* 18, 3989–3995.
- Lane, H.A., and Nigg, E.A. (1996). Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J. Cell Biol.* 135, 1701–1713.
- Larochelle, S., Pandur, J., Fisher, R.P., Salz, H.K., and Suter, B. (1998). Cdk7 is essential for mitosis and for in vivo Cdk-activating kinase activity. *Genes Dev.* 12, 370–381.
- Lee, K.S., Grenfell, T.Z., Yarm, F.R., and Erikson, R.L. (1998). Mutation of the polo-box disrupts localization and mitotic functions of the mammalian polo kinase Plk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9301–9306.
- Lens, S.M.A., Wolthuis, R.M.F., Klompaker, R., Kauw, J., Agami, R., Brummelkamp, T., Kops, G., and Medema, R.H. (2003). Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *EMBO J.* 22, 2934–2947.
- Van Leuken, R., Clijsters, L., and Wolthuis, R. (2008). To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim. Biophys. Acta* 1786, 49–59.
- Leung, G.C., Hudson, J.W., Kozarova, A., Davidson, A., Dennis, J.W., and Sicheri, F. (2002). The Sak polo-box comprises a structural domain sufficient for mitotic subcellular localization. *Nat. Struct. Biol.* 9, 719–724.
- Li, X., and Nicklas, R.B. (1995). Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature* 373, 630–632.
- Li, B., Ouyang, B., Pan, H., Reissmann, P.T., Slamon, D.J., Arceci, R., Lu, L., and Dai, W. (1996). Prk, a cytokine-inducible human protein serine/threonine kinase whose expression appears to be down-regulated in lung carcinomas. *J. Biol. Chem.* 271, 19402–19408.
- Lindon, C., and Pines, J. (2004). Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J. Cell Biol.* 164, 233–241.
- Liu, E., Lee, A.Y.-L., Chiba, T., Olson, E., Sun, P., and Wu, X. (2007). The ATR-mediated S phase checkpoint prevents rereplication in mammalian cells when licensing control is disrupted. *J. Cell Biol.* 179, 643–657.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., et al. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* 14, 1448–1459.
- Luo, X., Tang, Z., Rizo, J., and Yu, H. (2002). The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20. *Mol. Cell* 9, 59–71.
- Ma, S., Liu, M., Yuan, Y.O., and Erikson, R.L. (2003a). The serum-inducible protein kinase Snk is a G1 phase polo-like kinase that is inhibited by the calcium- and integrin-binding protein CIB. *Mol. Cancer Res.* 1, 376–384.
- Ma, S., Charron, J., and Erikson, R.L. (2003b). Role of Plk2 (Snk) in mouse development and cell proliferation. *Mol. Cell Biol.* 23, 6936–6943.

- Macûrek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M.A., Klompmaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S.S., Yaffe, M.B., and Medema, R.H. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* 455, 119–123.
- McGowan, C.H., and Russell, P. (1993). Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J.* 12, 75–85.
- Meraldi, P., Lukas, J., Fry, A.M., Bartek, J., and Nigg, E.A. (1999). Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat. Cell Biol.* 1, 88–93.
- Michaelis, C., Ciosk, R., and Nasmyth, K. (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 91, 35–45.
- Molinari, M. (2000). Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif.* 33, 261–274.
- Mueller, P.R., Coleman, T.R., Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 270, 86–90.
- Mundt, K.E., Golsteyn, R.M., Lane, H.A., and Nigg, E.A. (1997). On the regulation and function of human polo-like kinase 1 (PLK1): effects of overexpression on cell cycle progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 377–385.
- Myer, D.L., Robbins, S.B., Yin, M., Boivin, G.P., Liu, Y., Greis, K.D., Bahassi, E.M., and Stambrook, P.J. (2011). Absence of polo-like kinase 3 in mice stabilizes Cdc25A after DNA damage but is not sufficient to produce tumors. *Mutat. Res.* 714, 1–10.
- Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., and Nishida, E. (2003). Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *J. Biol. Chem.* 278, 25277–25280.
- Nigg, E. a (1998). Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 776–783.
- Nurse, P. (1997). Checkpoint pathways come of age. *Cell* 91, 865–867.
- Ohkura, H., Hagan, I.M., and Glover, D.M. (1995). The conserved *Schizosaccharomyces pombe* kinase plo1, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. *Genes Dev.* 9, 1059–1073.
- Ouyang, B., Pan, H., Lu, L., Li, J., Stambrook, P., Li, B., and Dai, W. (1997). Human Prk is a conserved protein serine/threonine kinase involved in regulating M phase functions. *J. Biol. Chem.* 272, 28646–28651.
- Pak, D.T.S., and Sheng, M. (2003). Targeted protein degradation and synapse remodeling by an inducible protein kinase. *Science* 302, 1368–1373.
- Peng, C.Y., Graves, P.R., Thoma, R.S., Wu, Z., Shaw, A.S., and Piwnicka-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 277, 1501–1505.
- Pfleger, C.M., and Kirschner, M.W. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* 14, 655–665.

- Piekny, A., Werner, M., and Glotzer, M. (2005). Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol.* *15*, 651–658.
- Qi, W., Tang, Z., and Yu, H. (2006). Phosphorylation- and polo-box-dependent binding of Plk1 to Bub1 is required for the kinetochore localization of Plk1. *Mol. Biol. Cell* *17*, 3705–3716.
- Rieder, C.L., Schultz, A., Cole, R., and Sluder, G. (1994). Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *J. Cell Biol.* *127*, 1301–1310.
- Ruan, Q., Wang, Q., Xie, S., Fang, Y., Darzynkiewicz, Z., Guan, K., Jhanwar-Uniyal, M., and Dai, W. (2004). Polo-like kinase 3 is Golgi localized and involved in regulating Golgi fragmentation during the cell cycle. *Exp. Cell Res.* *294*, 51–59.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, Z., Piwnicka-Worms, H., and Elledge, S.J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* *277*, 1497–1501.
- Sánchez, I., and Dynlacht, B.D. (2005). New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin. Cell Dev. Biol.* *16*, 311–321.
- Seong, Y., Kamijo, K., Lee, J., Fernandez, E., Kuriyama, R., Miki, T., and Lee, K.S. (2002). A spindle checkpoint arrest and a cytokinesis failure by the dominant-negative polo-box domain of Plk1 in U-2 OS cells. *J. Biol. Chem.* *277*, 32282–32293.
- Sharp-Baker, H., and Chen, R.H. (2001). Spindle checkpoint protein Bub1 is required for kinetochore localization of Mad1, Mad2, Bub3, and CENP-E, independently of its kinase activity. *J. Cell Biol.* *153*, 1239–1250.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* *91*, 325–334.
- Sillibourne, J.E., Tack, F., Vloemans, N., Boeckx, A., Thambirajah, S., Bonnet, P., Ramaekers, F.C.S., Bornens, M., and Grand-Perret, T. (2010). Autophosphorylation of polo-like kinase 4 and its role in centriole duplication. *Mol. Biol. Cell* *21*, 547–561.
- Simmons, D.L., Neel, B.G., Stevens, R., Evett, G., and Erikson, R.L. (1992). Identification of an early-growth-response gene encoding a novel putative protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 4164–4169.
- Smits, V.A., Klompaker, R., Arnaud, L., Rijksen, G., Nigg, E.A., and Medema, R.H. (2000). Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat. Cell Biol.* *2*, 672–676.
- Stemmann, O., Zou, H., Gerber, S.A., Gygi, S.P., and Kirschner, M.W. (2001). Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* *107*, 715–726.
- Strausfeld, U., Labbé, J.C., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Picard, A., Sadhu, K., Russell, P., and Dorée, M. (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* *351*, 242–245.
- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J. V, and Hershko, A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell* *6*, 185–197.

- Sudakin, V., Chan, G.K., and Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J. Cell Biol.* *154*, 925–936.
- Sumara, I., Giménez-Abián, J.F., Gerlich, D., Hirota, T., Kraft, C., de la Torre, C., Ellenberg, J., and Peters, J. (2004). Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles. *Curr. Biol.* *14*, 1712–1722.
- Sunkel, C.E., and Glover, D.M. (1988). polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J. Cell Sci.* *89*, 25–38.
- Tang, Z., Shu, H., Oncel, D., Chen, S., and Yu, H. (2004). Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Mol. Cell* *16*, 387–397.
- Taylor, W.R., DePrimo, S.E., Agarwal, A., Agarwal, M.L., Schönthal, A.H., Katula, K.S., and Stark, G.R. (1999). Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol. Biol. Cell* *10*, 3607–3622.
- Toyoshima, F., Moriguchi, T., Wada, A., Fukuda, M., and Nishida, E. (1998). Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *EMBO J.* *17*, 2728–2735.
- Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., Shinya, N., Iwamatsu, A., and Nishida, E. (2001). Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature* *410*, 215–220.
- Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., and Nishida, E. (2002). Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep.* *3*, 341–348.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupard, M.A., Koonin, E. V., and Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* *103*, 375–386.
- Vigneron, S., Prieto, S., Bernis, C., Labbé, J.-C., Castro, A., and Lorca, T. (2004). Kinetochores localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? *Mol. Biol. Cell* *15*, 4584–4596.
- Van Vugt, M.A.T.M., van de Weerd, B.C.M., Vader, G., Janssen, H., Calafat, J., Klomp, R., Wolthuis, R.M.F., and Medema, R.H. (2004a). Polo-like kinase-1 is required for bipolar spindle formation but is dispensable for anaphase promoting complex/Cdc20 activation and initiation of cytokinesis. *J. Biol. Chem.* *279*, 36841–36854.
- Van Vugt, M.A.T.M., Brás, A., and Medema, R.H. (2004b). Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. *Mol. Cell* *15*, 799–811.
- Waizenegger, I., Giménez-Abián, J.F., Wernic, D., and Peters, J.-M. (2002). Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Curr. Biol.* *12*, 1368–1378.
- Waizenegger, I.C., Hauf, S., Meinke, A., and Peters, J.M. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* *103*, 399–410.
- Wang, Q., Xie, S., Chen, J., Fukasawa, K., Naik, U., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., Jhanwar-Uniyal, M., and Dai, W. (2002). Cell cycle arrest and apoptosis induced by human Polo-like kinase 3 is mediated through perturbation of microtubule integrity. *Mol. Cell Biol.* *22*, 3450–3459.

- Warnke, S., Kemmler, S., Hames, R.S., Tsai, H., Hoffmann-Rohrer, U., Fry, A.M., and Hoffmann, I. (2004). Polo-like kinase-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.* *14*, 1200–1207.
- Watanabe, N., Arai, H., Nishihara, Y., Taniguchi, M., Watanabe, N., Hunter, T., and Osada, H. (2004). M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4419–4424.
- Weintraub, S.J., Prater, C.A., and Dean, D.C. (1992). Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* *358*, 259–261.
- Weiß, L., and Efferth, T. (2012). Polo-like kinase 1 as target for cancer therapy. *Exp. Hematol. Oncol.* *1*, 38.
- Wells, N.J., Watanabe, N., Tokusumi, T., Jiang, W., Verdecia, M.A., and Hunter, T. (1999). The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G(2)/M progression. *J. Cell Sci.* *112*, 3361–3371.
- Willis, N., and Rhind, N. (2009). Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell Div.* *4*, 13–23.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D., and Levine, A.J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* *7*, 1126–1132.
- Yang, Y., Bai, J., Shen, R., Brown, S. a N., Komissarova, E., Huang, Y., Jiang, N., Alberts, G.F., Costa, M., Lu, L., et al. (2008). Polo-like kinase 3 functions as a tumor suppressor and is a negative regulator of hypoxia-inducible factor-1 alpha under hypoxic conditions. *Cancer Res.* *68*, 4077–4085.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Rago, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1999). Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 14517–14522.
- Zetterberg, A., Larsson, O., and Wiman, K.G. (1995). What is the restriction point? *Curr. Opin. Cell Biol.* *7*, 835–842.
- Zimmerman, W.C., and Erikson, R.L. (2007). Polo-like kinase 3 is required for entry into S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 1847–1852.
- Zou, H., McGarry, T.J., Bernal, T., and Kirschner, M.W. (1999). Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* *285*, 418–422.