Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie

Klára Kořínková

Molekulární mechanismy regulace G2/M kontrolního bodu

Molecular mechanisms of G2/M checkpoint regulation

Bakalářská práce

Školitel: MUDr. Libor Macůrek, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

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

V Praze, 2. 5. 2016 Podpis:

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému školiteli MUDr. Liboru Macůrkovi, Ph.D. za možnost psát tuto práci pod jeho dohledem, za jeho vstřícnost a čas, který mně a mojí práci věnoval.

Abstrakt:

Buněčné dělení je nezbytné pro udržení homeostázy tkání, zároveň jsou však jeho defekty úzce spjaty s rozvojem řady onemocnění včetně nádorů a předčasného stárnutí. Aktivace onkogenů vede k replikačnímu stresu a přímo ohrožuje stabilitu genomu. Důležitým mechanismem pro ochranu integrity genomu je správná kontrola přechodu mezi interfází a mitózou. Jaderné dělení je umožněno jen buňkám, ve kterých došlo k bezchybnému zdvojení genetické informace. Naopak buňky s poškozenou strukturou DNA zůstávají dočasně či trvale zastaveny v G2 fázi buněčného cyklu. Předmětem této bakalářské práce je podrobná literární rešerše na téma molekulárních mechanismů regulace G2/M přechodu za normálních podmínek a za přítomnosti poškození DNA.

Klíčová slova:

Buněčný cyklus, kontrolní bod buněčného cyklu, poškození DNA, regulace buněčného cyklu, G2/M přechod, G2 kontrolní bod

Abstract:

Cell division is necessary for maintaining tissue homoeostasis, but at the same time its defects are closely related to the development of many diseases including cancer and premature ageing. Activation of oncogenes leads to replication stress and directly threatens genome stability. The right control of transition between interphase and mitosis is an important mechanism for the protection of genome integrity. Nuclear division is only possible with those cells in which flawless duplication of genetic information occurred. By contrast, cells with damaged DNA structure remain temporarily or permanently stopped at G2 phase of the cell cycle. The topic of this thesis is a detailed literature overview with the subject of molecular mechanisms of the G2/M transition regulation under unperturbed conditions and in the presence of damaged DNA.

Key words:

Cell cycle, cell cycle checkpoint, DNA damage, cell cycle regulation, G2/M transition, G2 checkpoint

Obsah

Úvod: ... 1
1. Regulace buněčného cyklu ... 2
1.1. Regulace CDK1 v průběhu buněčného cyklu ... 2
2. Přechod z G2 fáze do mitózy a regulace cyclin B-CDK1: ... 3
2.1. Inhibice: ... 3
2.2. Aktivace: ... 3
2.2.1. Rodina CDC25 fosfatáz ... 3
2.2.2. CDK-aktivující kináza ... 5
2.3. Vnitřní autoregulační smyčka ... 5
2.4. Vnější autoregulační smyčka ... 5
2.4.1. Regulace degradace WEE1 ... 6
2.4.2. Regulace fosforylace MYT1 ... 6
2.4.3. Aktivace CDC25C ... 6
2.4.4. Regulace PLK1 ... 6
2.5. Greatwall kináza/MASTL ... 8
2.6. Primární aktivace cyklin B-CDK1 ... 10
2.6.1. Cyklin A-CDK1/2 ... 10
2.6.2. CDC25A ... 10
2.6.3. CDC25B a Aurora A ... 10
2.6.4. Gwl ... 11
3. G2 checkpoit ... 12
3.1. Odpověď zprostředkovaná ATR ... 12
3.1.1. RPA závislá regulace lokalizace a aktivace ATR ... 12
3.1.2. Rad17/RFC a 9-1-1/PCNA ... 13
3.1.3. Další charakteristiky aktivace ATR ... 14
3.1.4. Aktivace CHK1 ... 15
3.1.5. Signalizace CHK1 a zastavení přechodu do mitózy ... 16
3.2. Odpověď závislá na ATM ... 18
3.2.1. Aktivace ATM ... 19
3.2.2. Šíření ATM signálu ... 21
3.2.3. Funkce ATM v zastavení cyklu ... 21
3.2.4. Role CHK2 v G2 kontrolním bodě ... 22
Závěr ... 24
Literatura: ... 25

Seznam zkratek:

APC/C	Anaphase promoting complex/cyclosome
ARPP19	cAMP-regulated phosphoprotein 19
AT	Ataxia telangiectasia
ATP	Adenosine triphosphate
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
ATRIP	ATR- interacting protein
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein
BRCT	BRCA1 C-terminal domain (C-koncová doména proteinu BRCA1)
CAK	Cyklin-dependent kinase activating kinase
CDC25	Cell division cycle 25
CDC25A	Cell division cycle 25A
CDC25B	Cell division cycle 25B
CDC25C	Cell division cycle 25C
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2
CDK7	Cyclin-dependent kinase 7
DDR	DNA damage response (odpověď na poškození DNA)
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSB	Double strand break (dvouvlánkový zlom)
dsDNA	Double stranded DNA (dvouvlánková DNA)
ENSA	αEndosulfine
G1	Gap 1 (fáze buněčného cyklu)
G2	Gap 2 (fáze buněčného cyklu)
GADD45	Growth arrest and DNA damage-inducible alpha
Gwl	Greatwall kinase
CHK1	Checkpoint kinase 1
CHK2	Checkpoint kinase 2
IR	Ionizing radiation
KAT5	Lysine acetytransferase 5
M	Mitosis (fáze buněčného cyklu)
MASTL	Microtubule associated serine/threonine kinase-like
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MPF	Mitosis promoting factor (mitózu podporující faktor)
MRE11	Meiotic recombination 11
MRN	Komplex proteinů Mre11-Rad50-Nbs1
MYT1	Membrane-associated tyrosine- and threonine-specific Cdk1-inhibitory kinase
NBN	Nibrin
NEK11	Never in mitosis gene a-related expressed kinase 11
NES	Nuclear export signal (jaderný exportní signál)
NLS	Nuclear localization signal (jaderný lokalizační signál)
PBD	Polo-box domain
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen (jaderný antigen proliferujících buněk)

PLK1	Polo-like kinase 1
PP1	Serine/threonine protein phosphatase 1
PP2A	Serine/threonine protein phosphatase 2A
PPM1D	Protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent 1D (protein fosfatáza závislá na Mg2+/Mn2+ 1D)
RFC	Replication factor C
RHINO	RAD9, HUS1, RAD1-interacting nuclear orphan
RPA	Replication protein A
Ser	Serine
SIRT2	Sirtuin-2
ssDNA	Single stranded DNA (jednovláknová DNA)
SUMO	Small ubiquitin-like modifier (malý, ubiquitinu podobný modifikátor)
Thr	Threonine
TIPIN	Timeless-interacting protein
TOPBP1	DNA topoisomerase 2-binding protein 1
Tyr	Tyrosin
9-1-1	Komplex proteinů Rad9-Hus1-Rad1
53PB1	Tumor suppressor p53-binding protein 1

Úvod:

Dělení buněk je základem pro vývoj a život mnohobuněčných organismů. Proliferující buňky periodicky procházejí sledem dějů, buněčným cyklem, který je zakončen rozdělením buňky. Během buněčného cyklu dochází v G1 (gap 1) fázi nejprve k přípravě buňky na zdvojení genetického materiálu. Teprve ve chvíli, kdy je buňka na tento proces dostatečně připravená, dochází v S (syntetické) fázi k duplikaci chromosomů. Následuje G2 (gap 2) fáze, ve které buňka kontroluje, jestli došlo k správné a úplné replikaci deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a jestli není přítomno žádné další poškození. Pokud je, musí být opraveno. Zároveň v této fázi dochází k tvorbě komponent, jež budou potřeba pro následné rozdělení buňky. Pokud je genetický materiál v pořádku a v buňce je přítomno vše potřebné, zahájí buňka M (mitotickou) fázi, během které dochází k rovnoměrné distribuci genetického materiálu do dvou dceřiných jader. Rozdělení jader bývá obvykle následováno rozdělením buňky. Jednotlivé fáze buněčného cyklu na sebe navazují a buňka může postupovat pouze vpřed. Přechod z jedné fáze do druhé se děje v důsledku hromadění signálů, které přechod podporují. Teprve ve chvíli, kdy je překročena určitá prahová hodnota těchto signálů, je zahájen rychlý a nevratný přechod do fáze další.

V kterékoli fázi cyklu může dojít k poškození DNA, které, pokud by nebylo opraveno, může mít fatální následky v podobě přenosu poškozené genetické informace do dceřiných buněk, které může vést až ke vzniku rakoviny, nebo pokud je poškození příliš velké, smrti buňky. Aby se tomuto předešlo, je důležité zajistit, že do mitózy vstoupí pouze buňky s nepoškozenou DNA.

To zajišťuje takzvaný G2 kontrolní bod, což je označení pro fázi buněčného cyklu, kdy se rozhoduje, zda bude buňce umožněno pokračovat v cyklu, stejně jako pro soubor dějů, které následují, pokud toto buňce umožněno být nemá. Kontrolní bod zajišťuje, že signalizuje-li něco v buňce o poškození DNA, spustí se kaskáda dějů, které vedou k dočasnému zastavení buňky v průběhu cyklem a opravě poškození, nebo smrti, pokud poškození opravit nelze.

Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o mechanismech, které vedou v savčích buňkách za normálních okolností ke vstupu buňky do mitózy, a o mechanismech, které fungují proti těmto procesům v důsledku poškození DNA.

1. Regulace buněčného cyklu

Hlavními regulátory buněčného cyklu jsou cyklin dependentní kinázy (CDK) v komplexu s proteiny cykliny. Cyklin dependentní kinázy jsou regulovány pomocí posttranslačních modifikací a aktivovány vazbou proteinu z rodiny cyklinů, jejichž hladiny se mění v různých fázích buněčného cyklu v závislosti na jejich zvýšené expresi nebo degradaci. Hladina CDK se oproti tomu v průběhu cyklu nemění. Pro regulaci přechodu z G2 fáze do mitózy je klíčový komplex cyklin dependentní kinázy 1 (CDK1) s cyklinem B, který je v literatuře označován jako mitózu podporující faktor (MPF), v menší míře se však uplatňují i jiné cykliny a CDK. Cyklin dependentní kinázy po vazbě cyklinu fosforylují mnoho substrátů a regulují tak jejich funkci.

1.1. Regulace CDK1 v průběhu buněčného cyklu

V průběhu G1 fáze je CDK1 v buňce přítomna ve formě inaktivního nefosforylovaného monomeru. Během S fáze dochází k tvorbě B1 cyklinu a jeho asociaci s CDK1. Vzniká tak heterodimer cyklinu B1-CDK1, který je neaktivní díky fosforylovanému tyrosinu15 (Tyr) a thereoninu14 (Thr). V průběhu G2 fáze dochází k akumulaci tohoto komplexu a na přechodu mezi G2/M fází je komplex aktivován defosforylací Tyr15 a Thr14 zbytků**.** Při výstupu z mitózy je cyklin B degradován díky anafázi podporujícímu komplexu/cyklosomu (APC/C) a CDK1 přestává být aktivní (podle Shackelford et al., 1999). Cyklin B-CDK1 je v průběhu interfáze lokalizován v cytoplasmě a do jádra vstupuje pouze na počátku mitózy před rozpadem jaderné laminy (Pines and Hunter, 1991).

2. Přechod z G2 fáze do mitózy a regulace cyclin B-CDK1:

V jádře je komplex cyclin B-CDK1 negativně regulován kinázou WEE1 (McGowan and Russell, 1995), a v cytoplasmě S membránou asociovanou tyrosin- a threonin-specifickou CDK1-inhibující kinázou (MYT1) (Liu et al., 1997). Pozitivní regulace je zprostředkována členy rodiny duálně specifických Cell division cycle 25 fosfatáz (CDC25), které cílová místa WEE1 a MYT1 defosforylují a tím CDK1 aktivují (viz dále).

2.1. Inhibice:

WEE1 je protein kináza, která fosforyluje Tyr15 (Parker and Piwnica-Worms, 1992), ale ne Thr14 CDK1 kinázy v komplexu s cyklinem B. MYT1 je schopná inhibovat aktivitu cyklin B-CDK1 dvěma způsoby, které jsou oba závislé na C-terminální cyklin B-CDK1 vazebné doméně MYT1. Vazba cyklin B-CDK1 zprostředkovaná touto doménou jednak umožňuje efektivní fosforylaci cyklin B-CDK1 komplexu MYT1 kinázou a tím její inhibici (Wells et al., 1999), jednak znemožňuje transport cyklin B-CDK1 do jádra (Liu et al., 1999). MYT1 je schopná fosforylovat jak Thr14, tak Tyr15 CDK1 kinázy, ale má silnější preferenci pro Thr14 (Liu et al., 1997).

2.2. Aktivace:

2.2.1. Rodina CDC25 fosfatáz

Za defosforylaci Thr14 a Tyr15 CDK1 jsou odpovědné duálně specifické fosfatázy CDC25. Savčí buňky obsahují tři isoformy Cell division cycle 25 A, B a C (CDC25A, CDC25B a CDC25C), které fungují v různých fázích buněčného cyklu (shrnuto v Boutros et al. 2006). Jejich funkce se pravděpodobně částečně překrývají, protože deplece každé isoformy snižuje aktivitu cyklin B-CDK1 z části, přičemž k úplné inhibici aktivity cyklin B-CDK1 je potřeba deplece všech tří CDC25 fosfatáz najednou (Mailand et al., 2002). Zároveň deplece CDC25A a B najednou má za následek větší opoždění vstupu do mitózy, než deplece každé isoformy zvlášť (Lindqvist et al., 2005). Dále bylo zjištěno, že myši s delecí CDC25C jsou životaschopné a nevykazují žádné abnormality ve fenotypu. Úroveň fosforylace cyklin B-CDK1, načasování vstupu do mitózy i buněčná odpověď na poškození DNA, jsou u těchto myší neporušeny (Chen et al., 2001). A nakonec, že myši s delecí CDC25B i C zároveň rovněž nevykazují žádný zvláštní fenotyp (Ferguson et al., 2005). To vše naznačuje, že funkce různých izoforem CDC25 jsou částečně zastupitelné buďto jinou izoformou, nebo jinou cestou.

2.2.1.1. CDC25 C

CDC25C je považována za hlavní fosfatázu zajišťující plnou aktivaci již částečně aktivní CDK1, protože pouze hyperfosforylovaná forma CDC25C byla schopná aktivovat CDK1 (Gabrielli et al., 1997) a tato forma CDC25C byla detekována až ve chvíli, kdy již bylo přítomno významné množství aktivní CDK1 (De Souza et al., 2000).

Aktivaci její fosfatázové aktivity zajišťuje extenzivní fosforylace N-terminálních serinových a threoninových zbytků cyklin B-CDK1 (Strausfeld et al., 1994) a Polo-like kinázou 1 (PLK1) (Elia et al., 2003). To znamená, že pro její plnou aktivaci je nutná již existující populace aktivní CDK1.

PLK1 fosforyluje v profázi ještě jiné aminokyselinové zbytky CDC25C, a to serin191 (Ser) a/nebo Ser198, které jsou lokalizovány v jaderném exportním signálu (NES), a jejichž fosforylace vede k rozrušení tohoto signálu a akumulaci CDC25C v jádře (Toyoshima-Morimoto et al., 2002). V profázi je také do jádra transportována subpopulace aktivní i neaktivní formy cytoplasmatické cyklin B-CDK1 (De Souza et al., 2000). Takto se mohou oba proteiny v jádře setkat a zahájit pozitivní zpětnovazebnou regulační smyčku, která vede k plné aktivaci obou.

V interfázi je CDC25C díky fosforylaci na Ser216 vázána na proteiny z rodiny 14-3-3, což způsobuje její zadržování v cytoplasmě. Fosforylace i vazba mizí, když buňka vstupuje do mitózy (Peng, 1997) a CDC25C se přesouvá do jádra. Kromě toho, že je zde v interfázi zadržována, je CDC25C do cytoplasmy aktivně transportována díky NES, která zajišťuje její exkluzi z jádra, dokud není tento signál rozrušen fosforylací PLK1 kinázou v profázi (Toyoshima-Morimoto et al., 2002).

Kromě jádra se CDC25C v mitóze vyskytuje také na centrosomech (Busch et al., 2007), tj. v místě, kde se vyskytuje aktivní CDK1 (Jackman et al., 2003).

2.2.1.2. CDC25B

CDC25B je považován za fosfatázu zodpovědnou na primární aktivaci CDK1 (viz kapitola 2.5.3), čemuž odpovídá i pozorování, že aktivita CDC25B je maximální v G2 fázi a mizí po vstupu buňky do mitózy (Lammer et al., 1998) a že inaktivace CDC25B vazbou na protein 14-3-3 brání přechodu buňky do M fáze (Cui et al., 2014).

Aktivita i lokalizace CDC25B je ovlivněna jeho vazbou na protein 14-3-3. CDC25B obsahuje Ser323 v C-koncové katalytické doméně a Ser151 a Ser160 v N-koncové regulační doméně. Všechny tři seriny zprostředkovávají vazbu na protein 14-3-3 a pokud je na něj fosfatáza navázána všemi třemi seriny, je blokována její katalytická doména a CDC25B je neaktivní. Zároveň tato vazba ovlivňuje přístupnost jaderného lokalizačního signálu (NLS) a NES a to tak, že vazba pouze N- respektive C-koncové domény vede ke zvýšenému exportu respektive importu CDC25B do jádra (Giles et al., 2003). To umožňuje regulaci její funkce v různých fázích buněčného cyklu a v různých místech buňky. Avšak zjištění ohledně lokalizace CDC25B v průběhu cyklu se velmi liší (shrnuto v Boutros et al. 2006), což může být způsobeno tím, že CDC25B kóduje tři sestřihové varianty, které se liší obsahem sekvencí v N-ternimální regulační doméně (Baldin et al., 1997). To může mít vliv na regulaci lokalizace každé konkrétní sestřihové varianty.

2.2.1.3. CDC25A

CDC25A je v interfázi buněčného cyklu rychle degradována, ale fosforylace cyklin B-CDK1 kinázou na Ser17 a Ser115 v průběhu mitózy vede k její stabilizaci. Naopak utrpí-li buňka poškození DNA, je indukována degradace CDC25A (Mailand et al., 2002). V této studii Mailand a kolektiv představili model, ve kterém CDC25A funguje paralelně s CDC25B v počáteční a s CDC25C v plné aktivaci CDK1. Navrhuje, že spolupráce dvou fosfatáz, udržujících CDK1 aktivní, zajišťuje robustnější kontrolu, aby na CDK1 nebylo možné cílit proteiny kontrolního bodu, pokud se buňka již zavázala k mitóze. Tento model také vysvětluje, proč myši s delecí CDC25C i B nevykazují žádný zvláštní fenotyp (Ferguson et al., 2005). A zároveň je podporován zjištěním, že CDC25A opravdu kooperuje s CDC25B v iniciaci mitózy, pro jejíž zahájení jsou potřebné oba dva proteiny a zároveň že deplece obou dvou proteinů najednou způsobuje větší zpoždění mitózy, než deplece každého samostatně (Lindqvist et al., 2005). Této dvojí roli CDC25A v aktivaci CDK1 odpovídá i to, že CDC25A neustále putuje mezi jádrem a cytoplasmou (Källström et al., 2005).

2.2.2. CDK-aktivující kináza

Kromě odstranění inhibičních fosforylací je pro aktivitu CDK1 nutná fosforylace Thr161 v aktivační T-smyčce, kterou zajišťuje cyklin-dependentní kinázu aktivující kináza (CAK) (Solomon et al., 1992). CAK kináza se skládá z komplexu Cyklin-dependentní kinázy 7 (CDK7) a cyklinu H (Fisher and Morgan, 1994). Defosforylaci Thr161 provádí dosud neznámá protein fosfatáza.

2.3. Vnitřní autoregulační smyčka

Cyklin B-CDK1 je tedy regulována pomocí WEE1, MYT1 a CDC25, ale sama je schopna tyto proteiny fosforylací pozitivně, v případě CDC25, a negativně, v případě WEE1 a MYT1, regulovat. Fosforylace CDC25C CDK1 kinázou je nutná pro její aktivaci (Strausfeld et al., 1994), naopak Cyklin B-CDK1 zprostředkovaná fosforylace WEE1 vede k její zvýšené, proteasomem zprostředkované, degradaci (Watanabe et al., 2004). A dále CDK1 závislá fosforylace MYT1 zahajuje kaskádu, která vede k inhibici kinázové aktivity MYT1 (Booher et al., 1997). Takto vzniká autoregulační zpětnovazebná smyčka, ve které CDK1 zvyšuje aktivitu svých vlastních aktivátorů a inhibuje své inhibitory. Protože vzájemné regulace všech komponent jsou zprostředkovány přímo, bývá tato smyčka označována jako vnitřní. Viz Obr. 1A.

2.4. Vnější autoregulační smyčka

Na pomyslnou vnitřní regulační smyčku popsanou výše navazují další regulační kroky, které umožňují posilovat nebo modulovat výsledky regulace vnitřní smyčky a tvoří tak pomyslnou vnější regulační smyčku.

Proteiny fosforylované cyklin B-CDK1 kinázou mohou být rozpoznávány polo-box doménou (PBD) PLK1. PBD funguje jako fosfo-serin a fosfo-threonin vazebný modul a zprostředkovává vazbu PLK1 na její substrát (Elia et al., 2003). Takto může PLK1 rozpoznávat a vázat stovky substrátů fosforylovaných v průběhu mitózy, z nichž část slouží zároveň jako její substrát (Lowery et al., 2007).

2.4.1. Regulace degradace WEE1

WEE1 fosforylovaná cyklin B-CDK1 na Ser123 je rozpoznávaná a fosforylovaná PLK1 kinázou na Ser53. Každá z těchto fosforylací vede ke zvýšené degradaci WEE1 v proteasomu. Fosforylace oběma kinázami zároveň ještě dále zvyšuje vazbu ubiquitin ligázy na WEE1 (Watanabe et al., 2004), viz Obr. 1B. Ubiqitin ligázy jsou enzymy, které na proteiny připojují peptid ubiquitin a tím je označují k degradaci v proteinovém komplexu proteasomu (shrnuto v Upadhya & Hegde 2005).

2.4.2. Regulace fosforylace MYT1

MYT1 je v průběhu mitózy hyperfosfroylovaná, což koreluje s poklesem její aktivity. CDK1 zprostředkovaná fosforylace pravděpodobně nemá přímý vliv na pokles aktivity MYT1 (Booher et al., 1997), ale vytváří vazebné místo pro PLK1, která je schopna fosforylovat MYT1 v průběhu M fáze a přispívá k její inaktivaci (Nakajima et al., 2003). Kinázy zodpovědné za inaktivaci MYT1 však nejsou zatím plně identifikované.

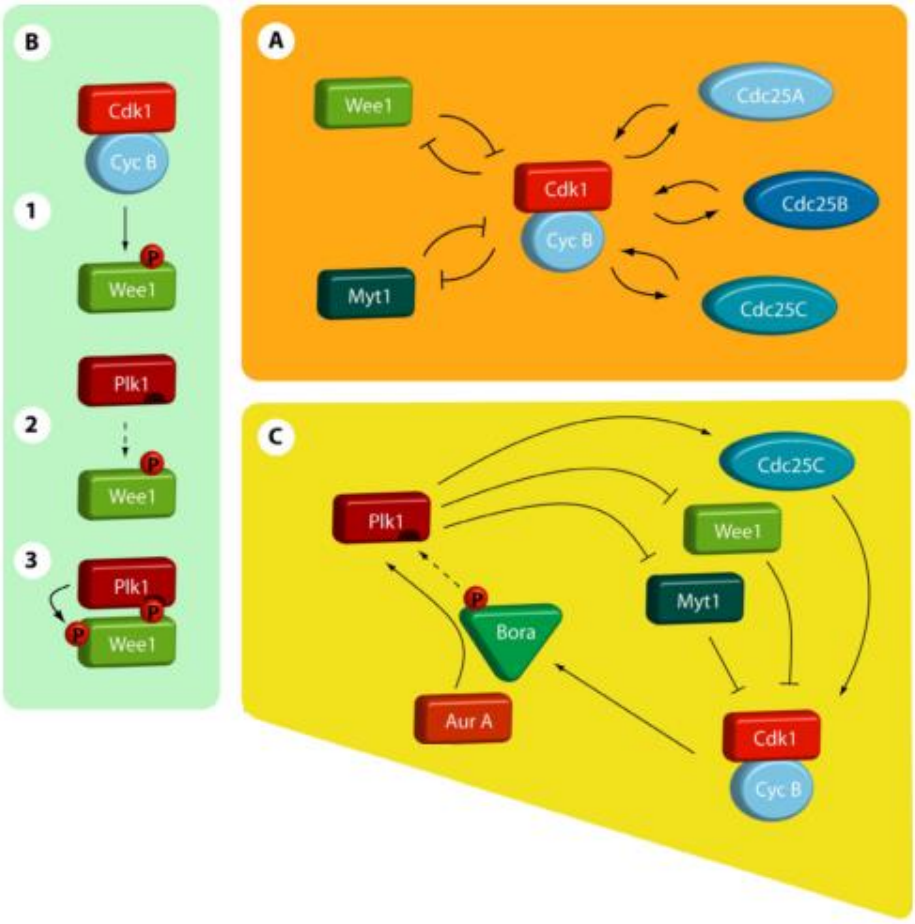
2.4.3. Aktivace CDC25C

Dále také PLK1 zprostředkovává aktivaci a jadernou lokalizaci CDC25C (Toyoshima-Morimoto et al., 2002) a cyklinu B1 v profázi (Toyoshima-Morimoto et al., 2001).

2.4.4. Regulace PLK1

Samotná PLK1 je fosforylována cyklin B-CDK1 in vitro, avšak vliv těchto fosforylací vede jen k velmi malému zvýšení aktivity PLK1 a jejich význam je nejasný (Hamanaka et al., 1995). Cyklin B-CDK1 se však uplatňuje v aktivaci PLK1 nepřímo. Pro aktivaci PLK1 je nutná její fosforylace Thr210 v aktivační „T smyčce“ (Qian et al., 1999). Pokud je PLK1 inaktivovaná, Thr210 je vázán PBD doménou a nepřístupný fosforylacím. Po fosforylaci Thr210 již znovu neinteraguje s PBD a PLK1 zůstává aktivní. (Jang et al., 2002). Fosforylaci Thr210 zajišťuje Aurora A v součinnosti s proteinem Bora, který zpřístupňuje Thr210 pro fosforylaci Aurorou A (Seki et al., 2008a). Viz Obr. 1C. Bora se může velmi slabě vázat na PLK1 bez účasti cyklin B-CDK1, avšak pokud je Bora fosforylována CDK1, váže se na PLK1 s větší účinností (Chan et al., 2008). Vazba Bora na PBD interferuje s vazbou substrátu PLK1. Aby tedy PLK1 mohla plnit své mitotické funkce, je nutné Bora odstranit poté, co PLK1 aktivuje (Seki et al., 2008a). Pokud k degradaci Bora nedojde, je narušen průběh mitózy. Po přechodu buňky do mitózy je tedy Bora z velké části degradována a tuto degradaci podporuje samotná PLK1 (Seki et al., 2008b). Avšak nízká hladina Bora je přítomná i v průběhu mitózy a to je dostačující pro udržení aktivity PLK1 (Bruinsma et al., 2014).

PLK1 není esenciální pro vstup do mitózy v buňkách, ve kterých nedošlo k narušení buněčného cyklu. Její deplece vede pouze k jeho opoždění a následně k zastavení dělení buněk v prometafázi, v důsledku neschopnosti buňky sestavit funkční dělící vřeténko. Avšak PLK1 je esenciální pro vstup do mitózy v buňkách, které byly zastaveny v G2 kontrolním bodě, a pro jejich návrat do normálního buněčného cyklu (van Vugt et al., 2004).



Obr. 1 Vnitřní a vnější regulační smyčka komplexu cyklin B-CDK1.

A: Vnitřní autoregulační smyčka.

B: Cyklin B-CDK1 zprostředkovaná fosforylace WEE1 na ní vytváří vazebné místo rozpoznávané PLK1 kinázou, která katalyzuje další fosforylaci WEE1 vedoucí k její degradaci.

C: PLK1 skrz nepřímo aktivuje cyklin B-CDK1 skrz aktivaci CDC25C a inhibici WEE1/MYT1 a zároveň je sama nepřímo regulována cyklin B-CDK1. Fosforylace Bora, katalyzovaná CDK1, vede k její zvýšené asociaci s PLK1, což je interakce nutná pro aktivační fosforylaci PLK1 zajišťovanou Aurorou A.

Převzato a upraveno z (Lindqvist et al., 2009).

2.5. Greatwall kináza/MASTL

Substráty fosforylované v rámci vnitřní autoregulační smyčky CDK1 kinázou jsou defosforylovány Serin/threonin-protein fosfatázou 2A (PP2A) (Mochida et al., 2009). PP2A fosfatázy se skládají ze tří podjednotek. Podjednotka C má serin/theroninovou fosfatázovou aktivitu, podjednotka A má strukturní funkci a podjednotka B zajišťuje regulaci a specifitu PP2A fosfatázy (Janssens et al., 2008). PP2A zodpovědná za defosforylaci substrátů CDK1 obsahuje regulační podjednotku B55 (Mochida et al., 2009). Kromě PP2A-B55 se však na defosforylaci substrátů CDK1 podílí i další fosfatázy (Hégarat et al., 2014). Defosforylace substrátů CDK1 zajišťuje, že nedojde k aktivaci přechodu buňky do mitózy jen na základě náhodných fluktuací v její aktivitě.

Avšak dojde-li na počátku mitózy k aktivaci dostatečně velké populace CDK1, může být aktivita PP2A-B55 inhibována dvěma způsoby, které oba vyžadují aktivitu CDK1 a zahrnují protein z rodiny Endosulfin. Jedná se o adenosin monofosfátem regulovaný fosfoprotein (ARPP19) a αEndosulfin (ENSA), které se váží na PP2A-B55 a inhibují její aktivitu (Gharbi-Ayachi et al., 2010).

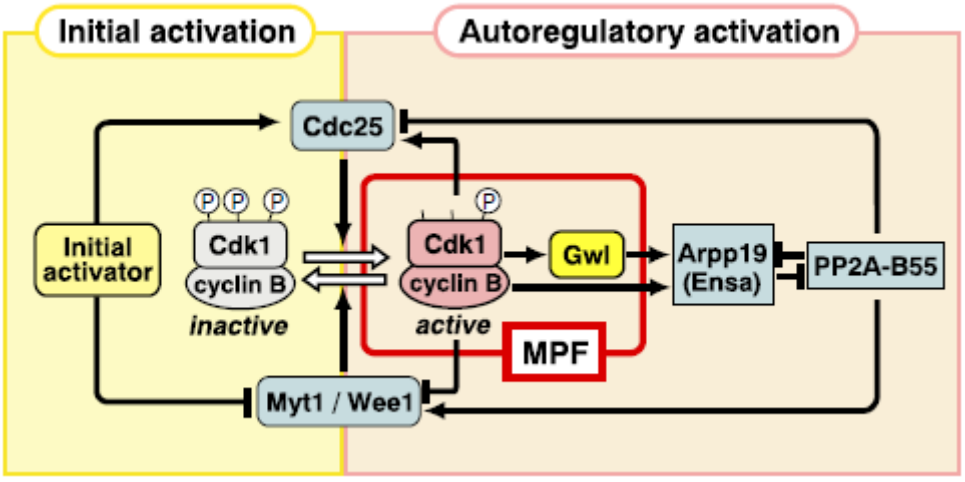
Tyto inhibitory jsou aktivovány cyklin B-CDK1 kinázou. U hvězdice to může být přímo fosforylací CDK1, nebo nepřímo, na jiných aminokyselinových zbytcích skrz Greatwall kinázu (Gwl) (Okumura et al., 2014), což je v souladu se zjištěním, že u hvězdice není Gwl esenciální pro plnou aktivaci CDK1 (Hara et al., 2012). Nebo zprostředkovaně fosforylací Gwl v extraktech z buněk žáby rodu *Xenopus* (Gharbi-Ayachi et al., 2010). Kinázová aktivita Gwl je indukována fosforylací Thr194 lokalizovaném v její aktivační smyčce CDK1 kinázou (Hégarat et al., 2014). Poté je již její další aktivita na CDK1 nezávislá (Castilho et al., 2009). Gwl *Xenopa* podstupuje autofosforylaci na Ser883 (u člověka odpovídá Ser875) (Blake-Hodek et al., 2012). Fosforylace tohoto serinu je nutná pro aktivaci jak žabí Gwl, tak lidského homologu S mikrotubuly asociovanou serin/threonin kinázou (MASTL). MASTL byla v této studii fosforylována na Ser875 CDK1 a PLK1 (Vigneron et al., 2011), avšak to nebylo potvrzeno v další studii, kde ani lidská PLK1 ani její žabí homolog nebyly schopny Gwl aktivovat, a CDK1 ani žabí PLK1 nebyly schopny fosforylovat fragment obsahující Ser883 in vitro. Navíc tento serin neodpovídá konsenzu rozpoznávanému PLK1 ani CDK1 (Blake-Hodek et al., 2012). V další studii na extraktech z vajíček *Xenopa* byla PLK1 sice schopna fosforylovat Gwl, avšak tato fosforylace neměla žádný viditelný efekt (Yu et al., 2006).

Za defosforylaci a inaktivaci MASTL na konci mitózy odpovídá fosfatáza PP25A-B55, která je ale sama MASTL inhibována a je proto nutný počáteční stimul jinou cestou, který vede k částečné inhibici aktivity MASTL. To zajišťuje Serin/threonin-protein fosfatáza 1 (PP1) (Rogers et al., 2016).

ARPP19 a ENSA jsou inhibitory, ale zároveň i substráty PP2A-B55. Jejich aminokyselinové zbytky, které jsou fosforylovány Gwl kinázou, mohou být zpětně defosforylovány a samotnou PP2A (Williams

et al., 2014) , viz Obr. 2. Avšak na jejich defosforylaci se podílí i jiná(é) fasfatáza(y) (Hégarat et al., 2014).

Byl navržen model, který popisuje, jak je PP2A, jejíž fosfatázová aktivita je v průběhu mitózy inhibována, schopna na konci mitózy sama svou aktivitu opět spustit. Dovozuje, že Endosulfin inhibitory jsou špatným, pomalu zpracovávaným substrátem pro PP2A fosfoatázu, zároveň se ale na ní váží velmi silně. Pokud jsou tedy v mitóze fosforylovány Gwl kinázou, váží se na PP2A, jsou jen pomalu defosforylovány a brání tak vazbě dalších, cyklin B-CDK1 kinázou fosforylovaných substrátů. Ty jsou sice defosforylovány rychleji, ale jejich vazba na PP2A je slabší a nemohou tak s Endosulfiny kompetovat. Když buňka vystupuje z mitózy, je aktivita cyklin B-CDK1, a tedy i Gwl, inhibována, Endosulfiny jsou pomalu, ale přece defosforylovány PP2A a ta je postupně schopna začít defosforylovat své ostatní substráty a rušit fosforylace mitotických substrátů CDK1. Model byl nazván „unfair competition“ (Williams et al., 2014).



Obr. 2 Role Gwl a PP2A v regulaci CDK1.

Cyklin B-CDK1 může být aktivován fosfatázou CDC25C a inhibován kinázami MYT1 a WEE1. Inhibitory ARPP19 a ENSA jsou aktivovány fosforylací Gwl a cyklin B-CDK1 kinázou a následně inhibují aktivitu PP2A-55B fosfatázy. PP2A defosforyluje substráty fosforylované cyklin B-CDK1 kinázou. Primární aktivaci regulátorů CDC25 a MYT1/WEE1 zajišťují další, počáteční aktivátory.

Převzato a upraveno z (Kishimoto, 2015).

Ačkoli je Gwl esenciální pro aktivaci cyklin B-CDK1 a vstup do mitózy v extraktech z vajíček *Xenopa* (Yu et al., 2006), není esenciální pro plnou aktivaci cyklin B-CDK1 a přechod do mitózy u hvězdice (Hara et al., 2012) a není známo, že by nějaký ortolog Gwl byl kódován v genomu Caenorhabditis elegans (Kim et al., 2012). U lidských buněk její deplece způsobuje pouze opoždění vstupu do mitózy (Voets and Wolthuis, 2010) a u myší nemá deplece Gwl na načasování vstupu do mitózy žádný vliv (Álvarez-Fernández et al., 2013). To naznačuje, že pro alespoň částečnou autoregulační aktivaci

cyklin B-CDK1 není Gwl esenciální, ale dostačuje aktivita ARPP19/ENSA zprostředkovaná přímo cyklin B-CDK1. Gwl však přispívá k plné aktivaci CDK1, protože ENSA fosforylovaná pouze cyklin B-CDK1 je schopna inhibovat PP2A méně účinně, než pokud je fosforylované Gwl (Mochida, 2014).

2.6. Primární aktivace cyklin B-CDK1

Výše popsané mechanismy jsou součástí autoregulačních smyčky cyklin B-CDK1, pro jejichž zahájení je nutná iniciační aktivace cyklin B-CDK1. Bylo ukázáno, že první aktivita cyklin B-CDK1 se objevuje v profázi v cytoplasmě na centrosomech, poté je část aktivní frakce CDK1 spolu s neaktivní frakcí CDK1 transportována do jádra, kde dochází k zahájení autoregulační smyčky a kompletní aktivaci cyklin B-CDK1 CDC25C fosfatázou (De Souza et al., 2000). Která/é molekula/y jsou zodpovědná/é za primární aktivaci CDK1 je u většiny somatických buněk vyšších eukaryot dosud neznámo, avšak následující molekuly v tomto procesu hrají podstatné role.

2.6.1. Cyklin A-CDK1/2

Cyklin A může vytvářet komplex s CDK1 i cyklin dependentní kinázou 2 (CDK2). Komplex cyklinu A-CDK2 lokalizuje na centrosomy, kde koordinuje aktivaci centrosomální a jaderné frakce cyklin B-CDK1. Deplece cyklin A-CDK2 vede k oddálení mitózy (De Boer et al., 2008). Naopak jeho vnesení do buněk v G2 fázi indukuje předčasný vstup do mitózy a v této kaskádě působí nad cyklin B-CDK1 (Furuno et al., 1999). Cyklin A tak pravděpodobně hraje důležitou roli v načasování vstupu buňky do mitózy a tuto roli by mohl plnit také tvorbou primárních fosforylací substrátů pro PLK1.

Dále bylo ukázáno, že cyklin A-CDK zprostředkovává aktivaci cyklin B-CDK1 skrz inhibici WEE1, a byl navržen model, v němž tato inhibice dává vzniku malého množství aktivní CDK1, které je dostatečné pro zahájení zpětnovazebné smyčky vedoucí k plné aktivaci CDK1 (Fung et al., 2007).

2.6.2. CDC25A

V souladu s výše zmíněným modelem je i pozorování, že CDC25A, která je schopná aktivovat komplexy cyklinu A/B a CDK, je aktivována v mitóze ještě dříve, než CDC25B (Timofeev et al., 2009). CDC25A by tak mohla být, ať už přímo nebo skrz aktivaci cyklin A-CDK, zodpovědná za tvorbu počáteční frakce aktivované CDK1.

2.6.3. CDC25B a Aurora A

Nedávno bylo ukázáno, že CDC25B je v průběhu cyklu lokalizovaná v cytoplasmě, jen v pozdní G2 fázi dochází k přemístění subpopulace do jádra (Cui et al., 2014). Ve stejnou dobu dochází k i její aktivaci (Xiao et al., 2011) a k translokaci subpopulace CDK1 do jádra (De Souza et al., 2000). CDC25B tak může pomáhat aktivaci jaderné frakce CDK1 na počátku mitózy.

Zároveň po fosforylaci Aurorou A lokalizuje CDC25B na centrosomy, kde je přítomná od profáze do metafáze (Dutertre et al., 2004). Zde může aktivovat CDK1, jejíž první aktivita byla detekována v profázi na centrosomech (De Souza et al., 2000) a jež zde hraje roli ve formaci dělícího vřeténka (shrnuto v T. Kishimoto 1994). Tomu odpovídá i fakt, že akumulace CDC25B v cytoplasmě koreluje s formováním dělícího vřeténka (Gabrielli et al., 1996)**,** a že Aurora je nutná pro aktivaci cyklin B-CDK1 na centrosomech (Hirota et al., 2003).

2.6.4. Gwl

Pro aktivaci Gwl je nutná fosforylace Thr194, která je v průběhu mitózy zajišťována cyklin B-CDK1 (Hégarat et al., 2014). Gwl však může být stejně účinně fosforylována i CDK2 v komplexu s cyklinem A, což by mohlo zajišťovat aktivaci Gwl před tím, než dojde k aktivaci cyklin B-CDK1 a Gwl by tak mohla přispívat k počáteční aktivaci cyklin B-CDK1 (Blake-Hodek et al., 2012).

Každý z výše zmíněných proteinů se nějakým způsobem účastní aktivace CDK1. Některé z nich jsou pro vstup buňky do mitózy esenciální, jiné ne, ale všechny dohromady vytváří komplexní síť regulací a pozitivních a negativních zpětnovazebných smyček. Vstup do mitózy tak není spouštěn jednou konkrétní molekulou, ale je výsledkem mnoha interakcí a regulací, které pomalu připravují buňku na přechod z G2 fáze. Poté, co je překročena určitá hranice, buňka rychle zahájí vsup do mitózy.

3. G2 checkpoit

Pokud replikace DNA proběhla správně, projde buňka kontrolním bodem a může vstoupit do mitózy. Pokud ale během replikace nebo po ní došlo k poškození DNA a toto poškození je buňkou rozpoznáno, spustí se kaskáda dějů, která vede k zastavení buňky v G2 fázi a buňce je ponechán čas na provedení oprav.

Podle typu poškození, jakému buňka čelí, se spouští různé signální kaskády spouštěné kinázami Ataxia-telangiectasia mutated (ATM), a Ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR), z rodiny phosphatidylinositol-3-OH kinase-related. Mutace ATM způsobuje autozomálně recesivně dědičný syndrom Ataxia-telangiectasia (AT), který se projevuje degenerací mozečku, chromosomální nestabilitou, imunodeficiencí, predispozicí k rakovině a dalšími příznaky (Savitsky et al., 1995). Zatím co ATM není pro život esenciální, homozygotní ztráta ATR vede u myší k časné embryonální letalitě (de Klein et al., 2000).

ATM je aktivována v reakci na dvouvláknové zlomy (DSB) v DNA (Pandita et al., 2000), zatímco ATR je aktivována širším spektrem poškození vedoucích ke vzniku jednovláknové DNA (Zou and Elledge, 2003). Ta může vznikat v průběhu oprav DNA procesem vystřižení nukleotidů, vystřižení báze nebo jako důsledek oprav pomocí homologní rekombinace, kterou je možno využít v buňkách obsahujících dvě sady chromozomů, tedy v buňkách v S a G2 fázi (shrnuto v Wood et al. 2001). Jednovláknová DNA vzniká také v průběhu replikace DNA a ve větší míře dojde-li k zastavení replikační vidlice. Rozpřažení aktivity DNA polymerázy a helikázy vede k aktivaci ATR (Byun et al., 2005).

Aby mohly být aktivovány kinázy ATM a ATR, musí dojít nejprve k detekci poškození. Za to zodpovídají tzv. sensor proteiny (=snímače), které rozpoznávají poškozenou DNA a rekrutují do jeho místa transdukční kinázy ATM a ATR. Tzv. mediátorové proteiny poté zajišťují specifitu interakcí senzorů a transdukčních kináz, které vedou k aktivaci efektorových kináz checkpoint kinázy 1 (CHK1) a checkpoint kinázy 2 (CHK2). Ty jsou zodpovědné za fosforylace mnoha buněčných substrátů, které ve výsledku vedou k zastavení progrese buňky buněčným cyklem. Toto rozdělení na senzory, mediátory, transducery a efektory však není přesné a odpovídají mu pouze některé proteiny.

3.1. Odpověď zprostředkovaná ATR

3.1.1. RPA závislá regulace lokalizace a aktivace ATR

ATR v buňce tvoří stabilní komplex s ATR-interagujícím proteinem (ATRIP) (Cortez et al., 2001). ATR-ATRIP komplex se přes protein ATRIP váže na jednovláknovou DNA (ssDNA) pokrytou ssDNA vazebným replikačním proteinem A (RPA), který se v S fázi účastní replikace DNA, ale ve zvýšené míře se váže na DNA i po jejím poškození (Zou and Elledge, 2003). ATR tímto způsobem lokalizuje do

ohnisek poškození DNA (Zou et al., 2002). Po vazbě na RPA pokrytou ssDNA podstupuje lidská ATR trans-autofosforylaci Thr1989. Autofosforylace je závislá na RPA a je nutná pro aktivaci ATR, protože generuje vazebné místo pro DNA topoisomerázu 2-vazebný protein 1 (TOPBP1), který stimuluje kinázovou aktivitu ATR (Liu et al., 2011) pomocí své ATR aktivační domény (Kumagai et al., 2006). Kromě ATR aktivační domény obsahuje TOPBP1 i Breast cancer type 1 susceptibility protein (BRCA1) C-terminální domény (BRCT), které fungují jako fosfoprotein vazebné moduly (Yu et al., 2003) a které jsou zodpovědné za jeho vazbu na fosforylovaný Thr1989 ATR (Liu et al., 2011).

TOPBP1 může být následně fosforylován ATM, což ještě posiluje jeho interakci s ATR a vede k její další aktivaci (Yoo et al., 2007). Protože vazba ATR na ssDNA je pozitivně závislá na délce ssDNA (Zou and Elledge, 2003), a protože ATR stimuluje svou aktivitu in-trans (Liu et al., 2011), je pravděpodobné, že RPA zprostředkovává i kvantitativní regulaci aktivace ATR. To bylo potvrzeno pozorováním, že míra aktivace CHK1, substrátu ATR, pozitivně koreluje s délkou ssDNA přítomné mezi dvěma úseky dsDNA (MacDougall et al., 2007). Kromě délky ssDNA, má i počet rozraní mezi ssDNA a dsDNA vliv na míru signalizace ATR (Van et al., 2010), a může tak přispívat ke kvantitativní regulaci ATR. Po aktivaci ATR fosforyluje stovky substrátů angažovaných v replikaci a opravách DNA, indukci apoptózy a aktivaci kontrolního bodu. Mezi nimi je i CHK1 kináza, která je esenciální pro spuštění drah kontrolního bodu (Liu et al., 2000).

3.1.2. Rad17/RFC a 9-1-1/PCNA

V průběhu replikace DNA, je rozhraní jednovláknové a naprimerované DNA rozpoznáváno proteinovým komplexem replikační faktor C (RFC), který za spotřeby adenositrifosfátu (ATP) na DNA rekrutuje proteinový komplex Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) a společně se podílejí na zahájení replikace (Tsurimoto and Stillman, 1991). Při signalizaci po poškození DNA se uplatňují komplexy Rad17 a Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1), které jsou homology RFC, respektive PCNA. Rad17, neboli RFC-like komplex se skládá ze 4 stejných podjednotek jako RFC, ale největší podjednotka p140 je v něm nahrazena proteinem Rad17. Rad17 se také váže na DNA, což stimuluje jeho ATPázovou aktivitu (Lindsey-Boltz et al., 2001). Frakce Rad17 se váže na chromatin bez ohledu na poškození DNA, avšak po poškození je tato frakce fosforylována a lokalizuje do ohnisek poškození. Po poškození DNA spolu s Rad17 do ohnisek poškození lokalizuje i ATR, avšak oba tyto děje jsou na sobě nezávislé. Rad17 poté na DNA rekrutuje komplex 9-1-1 (Zou et al., 2002), jehož všechny tři podjednotky jsou evolučně příbuzné podjednotkám PCNA a interagují spolu za vzniku struktury podobné struktuře PCNA (Venclovas and Thelen, 2000). Vazba Rad17 na DNA vyžaduje přítomnost jak RPA, tak rozhraní mezi jednovláknovou a dvouvláknovou DNA, avšak 9-1-1 rekrutuje preferenčně na 5´konec rozhraní (Ellison and Stillman, 2003), protože tento děj je na 3´konci inhibován proteinem RPA (Majka et al., 2006).

3.1.2.1. 9-1-1

Poté, co je 9-1-1 rekrutována na DNA, aktivuje ATR dvěma mechanismy. Na rozdíl od PCNA obsahuje podjednotka Rad9 komplexu 9-1-1 C-terminální sekvenci, která je schopna vázat se na protein TOPBP1 (Delacroix et al., 2007), který ATR aktivuje (Liu et al., 2011). A zároveň, alespoň u *Saccharomyces cerevisiae*, je její homolog 9-1-1 sám schopný stimulovat aktivitu ATR (Navadgi-Patil and Burgers, 2009), ačkoliv studie, která by tento mechanismus potvrzovala u člověka, zatím chybí. Za vazbu 9-1-1 na TOPBP1 je zodpovědný Ser387 podjednotky Rad9 (Delacroix et al., 2007), který je trvale fosforlyovaný (St Onge et al., 2003) a interaguje s BRCT doménami TOPBP1 (Delacroix et al., 2007). Rad17 poté, co rekrutuje 9-1-1 na chromatin, zůstává s chromatinem i 9-1-1 asociovaný a je nutný pro vazbu 9-1-1 na TOPBP1 (Lee and Dunphy, 2010). TOPBP1 je poté schopný, kromě stimulace kinázové aktivity ATR, iniciovat fosforylaci 9-1-1 ATR kinázou a to způsobem nezávislým na stimulaci kinázové aktivity ATR (Liu et al., 2011), což ukazuje, že TOPBP1 může fungovat i jako lešení pro zprostředkování protein-proteinových interakcí skrz asociaci svých BRCT domén s různými proteiny.

3.1.2.2. Rad17

Kromě rekrutace komplexu 9-1-1 na DNA má Rad17 ještě další funkce. Po poškození DNA je fosforylován na Ser646 a Ser656 ATR kinázou (Post et al., 2001). Fosforylace Ser635 a Ser645 Rad17 přispívá k jeho vazbě na protein Claspin (Wang et al., 2006), který indukuje aktivaci CHK1 (Kumagai et al., 2004).

3.1.3. Další charakteristiky aktivace ATR

Pro aktivaci ATR je dále důležitý protein RAD9, HUS1, RAD1-interacting nuclear orphan (RHINO), který tvoří stabilní heterotetramerní komplex s komplexem 9-1-1 a váže TOPBP1. Přestože mechanismus, jakým RHINO stimuluje aktivitu ATR, není dosud známý, nezahrnuje tento proces s největší pravděpodobností ani stabilizaci interakce 9-1-1 s TOPBP1, ani stimulaci asociace 9-1-1 s chromatinem (Lindsey-Boltz et al., 2015).

Specifita aktivace ATR je zajištěna tím, že k aktivaci ATR dochází až ve chvíli, kdy se spojí dvě, do jisté míry nezávislé dráhy. Do míst poškození musí lokalizovat ATR, aby mohla zprostředkovat svou autofosforylaci, nutnou pro její interakci s TOPBP1. Tato autofosforylace je nezávislá na Rad17 i TOPBP1 (Liu et al., 2011). A zároveň musí do ohnisek poškození lokalizovat Rad17, v závislosti na něm 9-1-1 a nakonec TOPBP1, který plně aktivuje ATR.

To, že pro vazbu TOPBP1 musí být 9-1-1 zároveň asociován s Rad17 (Lee and Dunphy, 2010), dále zajišťuje kontrolu, že TOPBP1 aktivuje ATR pouze, pokud se s ní setká v místech poškození. Avšak protože lokalizace jak Rad17, tak ATR-ATRIP do míst poškození vyžaduje RPA, nejsou tyto dráhy úplně nezávislé. Jednovláknová DNA tedy funguje jako platforma pro setkávání a koncentraci různých

proteinů, které by se za normálních okolností nesešly v takové míře, aby došlo k efektivní aktivaci a signalizaci. Což potvrzují pozorování, že k aktivaci ATR bez přítomnosti poškození DNA stačí pouze nadměrná expres TOPBP1 (Kumagai et al., 2006), nebo uměle navozená kolokalizace Rad9 s ATRIP (Bonilla et al., 2008).

Základní schéma regulace počátečních kroků aktivace kontrolního bodu v G2 fázi je známo, avšak detaily molekulárních interakcí a posttranslačních modifikací jednotlivých komponent jsou teprve mapovány. Například nedávno bylo ukázáno, že SUMOylace ATRIP ovlivňuje signalizaci ATR na několika úrovních (Wu et al., 2014). SUMOlyace je proces kovalentního připojení malých proteinů podobných ubiquitinu (SUMO) na lysinové zbytky jiných proteinů, což vede k regulaci funkce takto modifikovaných proteinů (shrnuto v Gareau & Lima 2010). ATRIP SUMOylovaný na Lys234 a Lys289 vykazuje zvýšenou vazbu na ATR, RPA, TOPBP1 a komplex Meiotic recombination 11 (MRE11)-RAD50-Nibrin (NBN) (= Mre11-Rad50-NBN = MRN). Tato modifikace usnadňuje lokalizaci komplexu ATR-ATRIP do míst poškození DNA a usnadňuje fosforylaci CHK1. Sumoylace ATRIP pravděpodobně zvyšuje jeho schopnost tvořit komplex s ATR a dalšími proteiny, protože ATR, stejně jako RPA, TOPBP1 a MRN, vykazuje afinitu k sumo řetězcům v buněčných extraktech a purifikovaný TOPBP1 i MRN se SUMO řetězci přímo interagují (Wu et al., 2014). Dále bylo zjištěno, že RPA je po poškození DNA ubiquitinylován a tato modifikace vede k jeho zvýšené vazbě na ATRIP a k zvýšené aktivitě ATR. Podobná modifikace dalších proteinů angažovaných v odpovědi na poškození DNA by mohla vytvářet kotvu pro zvýšení nebo prodloužení interakcí těchto proteinů s komplexem ATR-ATRIP (Maréchal et al., 2014). Na rozdíl od předchozích dvou modifikací, které zvyšují vazbu ATR-ATRIP na mnoho substrátů najednou, acetylace ATRIP na Lys32 snižuje autofosforylaci a další aktivitu ATR a také lokalizaci ATRIP do míst poškození DNA způsobeného hydroxyureou a ionizačním zářením (IR). Naopak deacetylace tohoto zbytku deacetylázou Sirtuin2 (SIRT2), jejíž aktivita je stimulována, když buňka čelí replikačnímu stresu, zvyšuje vazbu ATRIP specificky na RPA-ssDNA a usnadňuje lokalizaci ATR do místa poškození (Zhang et al., 2016).

3.1.4. Aktivace CHK1

CHK1 je v interfázi lokalizovaná převážně v jádře, kde se aktivně podílí na oddálení vstupu do mitózy v důsledku předčasné aktivace CDK1, a to pravděpodobně inhibicí CDC25 fosfatáz. Na přechodu mezi G2 a M je fosforylována CDK1 kinázou na Ser286 a Ser301, což vede k jejímu exportu do cytoplasmy. Exkluze CHK1 z jádra může usnadňovat aktivaci CDK1 v jádře (Enomoto et al., 2009). Zároveň část CHK1 v interfázi lokalizuje na centrosom, kde předchází předčasné aktivaci centrosomální subpopulaci CDK1 (Tibelius et al., 2009).

CHK1 je po poškození DNA fosforylovaná na Ser345, Ser317 a v menším rozsahu na Ser366 lokalizovaných v C-terminální doméně. Fosforylace Ser345 je esenciální pro nárůst aktivity CHK1 po poškození DNA a pro spuštění kontrolního bodu, zatím co Ser317 a Ser365 k aktivaci přispívají jen částečně a usnadňují fosforylaci Ser345. CHK1 je aktivována po poškození DNA v S fázi a G2 fázi buněčného cyklu, zatím co její aktivace v G1 fázi je velmi nízká (Walker et al., 2009). Podobná fosforylace CHK1 ATR kinázou je přítomná od kvasinek (Lopez-Girona et al., 2001), přes žáby rodu *Xenopus* (Guo et al., 2000), až po lidské buňky (Liu et al., 2000), což vypovídá o její důležitosti pro život buňky.

Pro plnou fosforylaci Ser345 je kromě pomocných Ser317 a Ser366 potřeba i součinnosti C-terminální domény CHK1, která zřejmě zahrnuje změnu konformace a uvolnění katalytické domény. Podobný mechanismus byl ukázán na lidských buňkách (Wang et al., 2012), i na kvasinkových (Kosoy and O'Connell, 2008). Protože kinázová doména CHK1 je stále v „otevřené" konformaci a nevyžaduje pro svou aktivaci fosforylaci (Chen et al., 2000), funguje C-terminální doména pravděpodobně jako inhibitor kinázové domény a jejich disociace vede k aktivaci CHK1 (Walker et al., 2009). Mutace v této C-terminální doméně indukuje zároveň aktivaci a degradaci CHK1 proteasomem (Zhang et al., 2009), což naznačuje, že po aktivaci mění CHK1 konformaci ze „zavřené", katalyticky neaktivní, avšak odolné vůči degradaci na konformaci „otevřenou", aktivní a nestabilní. Rychlá degradace aktivní CHK1 umožňuje rychlé ukončení její signalizace ve chvíli, kdy je poškození opraveno.

Aktivaci CHK1 zprostředkovává claspin, který indukuje autofosforylaci CHK1 *Xenopa* na Ser344 (který odpovídá lidskému Ser 345) a také její fosforylaci ATR na Ser344 (Kumagai et al., 2004). Claspin také zvyšuje kinázovou aktivitu ATR specificky vůči CHK1 (Lindsey-Boltz et al., 2009)**.** Sám je CHK1 kinázou stabilizován CHK1. Degradace claspinu indukovaná PLK1 kinázou je nutná pro navrácení buňky z kontrolního bodu do buněčného cyklu a umlčení odpovědi na poškození (Mamely et al., 2006). Touto pozitivní zpětnovazebnou smyčkou je zajištěna efektivní aktivace CHK1 v odpovědi na poškození DNA a zároveň umlčení její signalizace ve chvíli, kdy je buňka připravena znovu vstoupit do buněčného cyklu. Pro vazbu claspinu na DNA je dostatečný a nutný Timeless-interacting protein (TIPIN), který váže zároveň RPA a claspin a podílí se na specifické aktivaci CHK1, ale ne dalších substrátů ATR (Kemp et al., 2010).

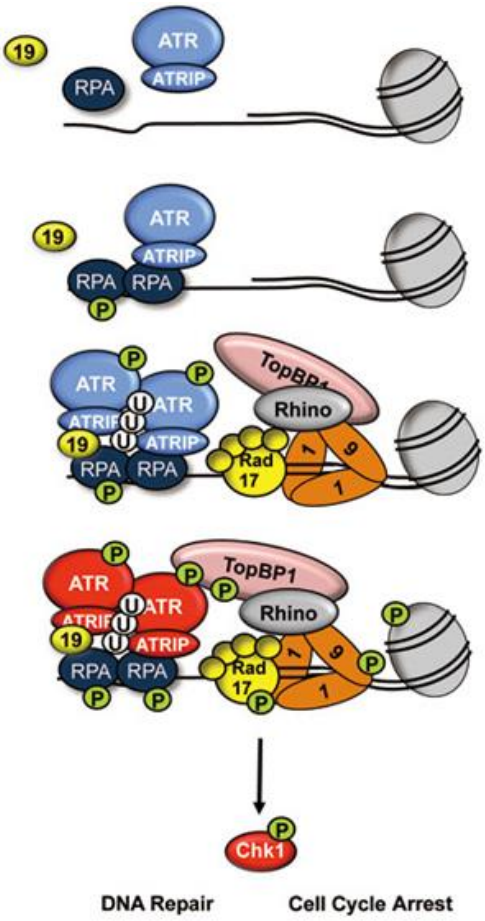
3.1.5. Signalizace CHK1 a zastavení přechodu do mitózy

Po fosforylaci CHK1 difunduje z chromatinu do jádra a následně do cytoplasmy, kde může fosforylovat své substráty a kde je také degradována. Degradace aktivní CHK1 zajišťuje, že kontrolní bod nebude přetrvávat poté, co bylo poškození opraveno a umožňuje rychlý návrat buňky do cyklu (Zhang et al., 2005). V jádře CHK1 fosforyluje WEE1, což vede k inhibici aktivity CDK1 díky zvýšené

fosforylaci Tyr15 (O'Connell et al., 1997). Dále fosforyluje fosfatázu CDC25C na Ser216 (Sanchez, 1997), což vede k její sekvestraci v cytoplasmě skrz protein 14-3-3 a inaktivaci (Peng, 1997).

Stejný mechanismus se uplatňuje i při regulaci CDC25A, která je také schopna se po fosforylaci CHK1 vázat na protein 14-3-3 a, stejně jako CDC25C má tato vazba za následek neschopnost CDC25A defosforylovat CDK1 (Chen et al., 2003). CHK1 je sama schopná vazby na protein 14-3-3, a to v důsledku autofosforylace serinu 296. To usnadňuje její interakci s CDC25A a další fosforylaci CDC25A na Ser76 (Kasahara et al., 2010). Fosforylace tohoto a několika dalších serinů CHK1 kinázou indukuje proteasomem zprostředkovanou degradaci CDC25A, i když pouze fosforylace Ser76 je pro degradaci esenciální a ostatní zbytky tento proces pravděpodobně usnadňují (Jin et al., 2003). A nakonec CHK1 zprostředkovaná fosforylace Never in mitosis gene a-related expressed kinase 11 (NEK11) vede k její aktivaci. NEK11 poté fosforyluje CDC25A a dále indukuje jeho degradaci (Melixetian et al., 2009).

Všechny tyto děje zajišťují inaktivaci CDK1 v případě, že buňka čelí poškození DNA a ponechávají jí čas na opravu. Je tak zabráněno vstupu buňky do mitózy, která by mohla mít fatálními následky, kdyby DNA nebyla opravena. Zároveň je však nutné, aby buňka mitózu dokončila, jakmile se jednou již pro tento proces zavázala. To je zajištěno tím, že v pozdní G2 fázi dochází k inhibici zpracování poškozené DNA, které vede ke vzniku ssDNA. To má za následek, že proteiny angažované v signalizaci kontrolního bodu, jako například RPA a ATR, nelokalizují do míst poškození a nepředávají signál o poškození dále a nedochází k aktivaci CHK1 (Xu et al., 2010). Detaily mechanismu, jakým jsou tyto dráhy inhibovány, však ještě bude nutné zmapovat.



Obr. 3 Signalizace ATR

Jednovláknová DNA je v buňce pokryta RPA proteinem, který rekrutuje ATR-ATRIP komplex. Ubiquitilylace RPA dále posiluje jeho interakci s ATR-ATRIP. ATR poté podstupuje autofosforylaci.

Rozhraní mezi ssDNA a dsDNA je rozpoznáváno komplexem Rad17, na který se váže komplex 9-1-1. Ten interaguje s proteinem RHINO a TOPBP1. TOPBP1 poté váže fosforylovanou ATR a aktivuje jí, což vede k aktivaci CHK1 kinázy.

Převzato a upraveno z (Maréchal and Zou, 2015).

3.2. Odpověď závislá na ATM

ATM je aktivována ve stejné míře ve všech fázích buněčného cyklu (Pandita et al., 2000). Je aktivována DSB s tupými konci a do menší míry i s přesahy několik nukleotidů. Avšak delší přesahy vznikající v průběhu resekce DSB aktivaci ATM znemožňují. Děje se tak díky kompetici MRN komplexu, který je důležitý pro aktivaci ATM, s jinými proteiny o vazbu na DNA. Tímto kompetujícím proteinem by mohl být RPA. V průběhu resekce DSB tak dochází k inhibici ATM signalizace a k následné aktivaci ATR signální dráhy (Shiotani and Zou, 2009).

3.2.1. Aktivace ATM

3.2.1.1. MRN komplex

MRN komplex je klíčový aktivátor ATM. Skládá se z proteinu MRE11, RAD50 a NBN. Jeho důležitost dokládá skutečnost, že mutace v jeho podjednotce MRE11 (Stewart et al., 1999) nebo NBN (Varon et al., 1998) způsobují fenotyp podobný defektu ATM.

MRN je jedním z prvních komplexů, které lokalizují do ohnisek poškození DNA a funguje tak specificky jako senzor DSB (Maser et al., 1997). Tato lokalizace je nezávislá na ATM (Mirzoeva and Petrini, 2001). NBN podjednotka poté váže a aktivuje ATM (Falck et al., 2005).

Pro počáteční lokalizaci MRN do míst poškození se ukázal být důležitý Rad17 komplex, který po fosforylaci ATM na Thr622 interaguje s NBN podjednotkou MRN komplexu a rekrutuje ho do míst DSB. Zároveň tato fosforylace indukuje aktivaci a lokalizaci ATM do míst DSB. Tato cesta závislá na Rad17 se uplatňuje v počátečních fázích odpovědi na DSB a je nezávislá na MRN1 (Wang et al., 2014), což podporuje i studie, ve které byl histon H2AX, alespoň pro počáteční fáze lokalizace MRN do míst DSB, ukázán jako postradatelný (Yuan and Chen, 2010).

3.2.1.2. Role autofosforylace v aktivaci ATM

ATM v průběhu nenarušeného buněčného cyklu existuje v buňce ve formě inaktivního dimeru, nebo multimeru a to převážně v jádře. Katalytická doména jedné molekuly ATM se váže na sekvenci v okolí Ser1981, což brání přístupu substrátu do katalytického místa. Jako první byl navržen model, v němž autofosforylace tohoto serinu inhibuje vazbu dvou ATM a vede k aktivaci ATM. Bylo totiž ukázáno, že tato fosforylace je katalyzována samotnou ATM in trans. Tento model podporovalo i zjištění, že mutace Ser1981 na alanin není schopná komplementovat nefunkční ATM a chová se jako dominantně negativní alela jak pro autofosforylaci Ser1981, tak spuštění kontrolního bodu v G2, i když tato mutace neinhibuje kinázovou aktivitu ATM in vitro. Bylo také zjištěno, že ATM se pro aktivaci pravděpodobně nemusí vázat přímo do místa poškození, ale rozpoznává změnu ve vyšších strukturách chromatinu (Bakkenist and Kastan, 2003). Později se ale ukázalo, že se při aktivaci ATM uplatňuje složitější proces, protože bylo zjištěno, že myši s mutací serinu odpovídajícímu Ser1981 na alanin nevykazují žádný zvláštní fenotyp na buněčné ani organismální úrovni (Pellegrini et al., 2006). Stejně tak bylo ukázáno na extraktech z buněk *Xenopa*, že ATM může být aktivována i v nepřítomnosti autofosforylace za přítomnosti velké koncentrace DNA (Dupré et al., 2006). To naznačuje, že tato autofosforylace není esenciální pro aktivaci ATM. Mohla by ale bránit reasociaci již aktivovaných ATM a tím jejich inhibici. Později bylo také ukázáno, že fosforylace Ser1981 je nutná pro interakci ATM s proteinem MDC1, který zajišťuje její udržení v místech poškození (So et al., 2009).

Nedávno byla popsána autofosforylace dalších AMK zbytků ATM. Některé z nich jsou lokalizované blízko, nebo v doméně zodpovědné za rozpoznávání substrátu a mohou se tak podílet na regulaci tohoto procesu. Další, konkrétně Ser2996, je lokalizovaný v regulační doméně blízko katalytické domény a jeho fosforylaci po IR je důležitá pro signalizaci ATM. Jiné z nich by mohly hrát roli ve vazbě dalších proteinů na ATM (Kozlov et al., 2011). Tři z těchto míst, konkrétně Ser1981, Ser1893 a Ser367, byla ukázána jako důležitá pro signalizaci ATM. Jejich mutace na alanin nevedla k poklesu autofosforylační ani další kinázové aktivity ATM in vitro, ale vedla k neschopnosti ATM komplementovat defekty v opravách a kontrolních bodech AT buněk. Mutace těchto zbytků na glutamovou kyselinu opět nezpůsobila trvalou aktivaci ATM, avšak způsobila zvýšenou aktivitu ATM po IR (Kozlov et al., 2006). Myši s mutací těchto zbytků na alanin ovšem opět nevykazovaly žádný zvláštní fenotyp ani defekty v aktivitě ATM po DSB (Daniel et al., 2008). To naznačuje, že tyto fosforylace ovlivňují spíše interakci se substrátem, než aktivitu ATM.

3.2.1.3. Role acetylace v aktivaci ATM

Kromě fosforylace bylo ukázáno, že také acetylace ATM má vliv na aktivitu ATM. Po DNA poškození je Lys3016 acetylován lysin acetyl transferázou (KAT5) s kinetikou podobnou autofosforylaci Ser1981. To vede k disociaci ATM na monomery, její aktivaci a nakonec autofosforylaci (Sun et al., 2007). ATM tvoří v buňkách komplex s KAT5 jak před, tak po poškození DNA. Po poškození DNA tento komplex lokalizuje do míst poškození (Sun et al., 2005). Lokalizaci ATM-KAT5 do míst poškození zprostředkovává MRN komplex. Následně KAT5 interaguje s histonem H3 trimethylovaným na Lys9, což stimuluje jeho acetylázovou aktivitu a acetyluje ATM (Sun et al., 2009).

3.2.1.4. Regulace aktivity ATM fosfatázami

V průběhu normálního buněčného cyklu ATM interaguje s fosfatázou PP2A, která zajišťuje defosforylaci Ser1981, avšak po působení IR PP2A od ATM disociuje. Deplece PP2A vede k nárůstu autofosforylace ATM odpovídajícímu ozáření buněk 10 gray, avšak nevede k nárůstu kinázové aktivity ATM (Goodarzi et al., 2004). Další důležitou fosfatázou pro regulaci ATM je Serin/threonin protein fosfatáza 1 (PP1). Inhibice samotné PP1 není schopna spustit odpověď na poškození DNA (DDR) bez přítomnosti poškození, avšak je schopna tuto odpověď umocnit po nízkých dávkách IR. Deplece obou těchto fosfatáz najednou je schopna spustit DDR nezávislou na přítomnosti poškození DNA, což naznačuje jejich klíčovou roli v regulaci ATM. PP1 je vázána na chromatin díky protienu Repo-Man, který také zprostředkovává interakci PP1 s ATM a po IR od ATM disociuje (Peng et al., 2010). K umlčení signalizace ATM ve chvíli, kdy je dokončena oprava DNA přispívá fosfatáza protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent 1D (PPM1D = Wip1), která defosfroyluje Ser1981 ATM (Shreeram et al., 2006).

3.2.2. Šíření ATM signálu

Po své aktivaci v místě poškození DNA ATM fosforyluje histon H2AX v okolí zlomů DNA a vzniká tak γH2AX (Savic et al., 2009). Na H2AX se prostřednictvím své BRCT domény váže protein Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1), který takto pravděpodobně fyzicky brání defosforylaci H2AX (Stucki et al., 2005). Navíc dále podporuje fosforylaci dalších molekul H2AX ve svém okolí tím, že do těchto míst přivádí ATM. Mdc1 přímo interaguje s ATM skrz fosforylaci na Ser1981 ATM (So et al., 2009), ale po fosforylaci casein kinázou 2 také interaguje svou FHA doménou s NBN MRN komplexu a přivádí tak ATM do ohnisek nepřímo (Wu et al., 2008). Je tedy pravděpodobné, že ATM po počáteční aktivaci v blízkosti zlomů na DNA fosforyluje H2AX ve svém okolí. Na takto modifikovaný histon se poté váže MDC1, který do těchto míst přivádí další molekuly ATM a ta opět fosforyluje H2AX ve své blízkosti. Takto se signál šíří z ohnisek poškození dále po chromatinu. To bylo potvrzeno ve studii, ve které bylo také ukázáno, že H2AX se vyskytuje v největších množstvích v blízkosti DSB do 200 kilobazí, kde je jeho vznik závislý na MDC1, zatím co nižší výskyt sahá do vzdáleností až 600 kilobazí. V těchto větších vzdálenostech je však vznik H2AX nezávislý na MDC1 a je závislý na solubilní ATM (Savic et al., 2009). V souladu s tímto modelem je i zjištění, že MDC1 je po poškození DNA fosforylován ATM na threoninu 4, což vede k dimerizaci MDC1 a usnadňuje jeho lokalizaci do míst poškození (Liu et al., 2012). Dimerizace MDC1 může usnadňovat šíření signálu a umocňovat roli MDC1 jako lešení pro různé proteinové interakce, protože dimer může vázat více interagujících proteinů DDR, což kromě výše zmíněné ATM a MRN komplexu je i CHK2 (Lou et al., 2003). Dále by mohl skrz vazbu dvou H2AX najednou zprostředkovávat přiblížení dvou jinak vzdálených histonů.

Ve chvíli, kdy je poškození opraveno, je H2AX defosforylovaný fosfatázou **(Macůrek et al., 2010)**. To znemožňuje vazbu dalších proteinů a vede k disociaci akumulovaných proteinů.

3.2.3. Funkce ATM v zastavení cyklu

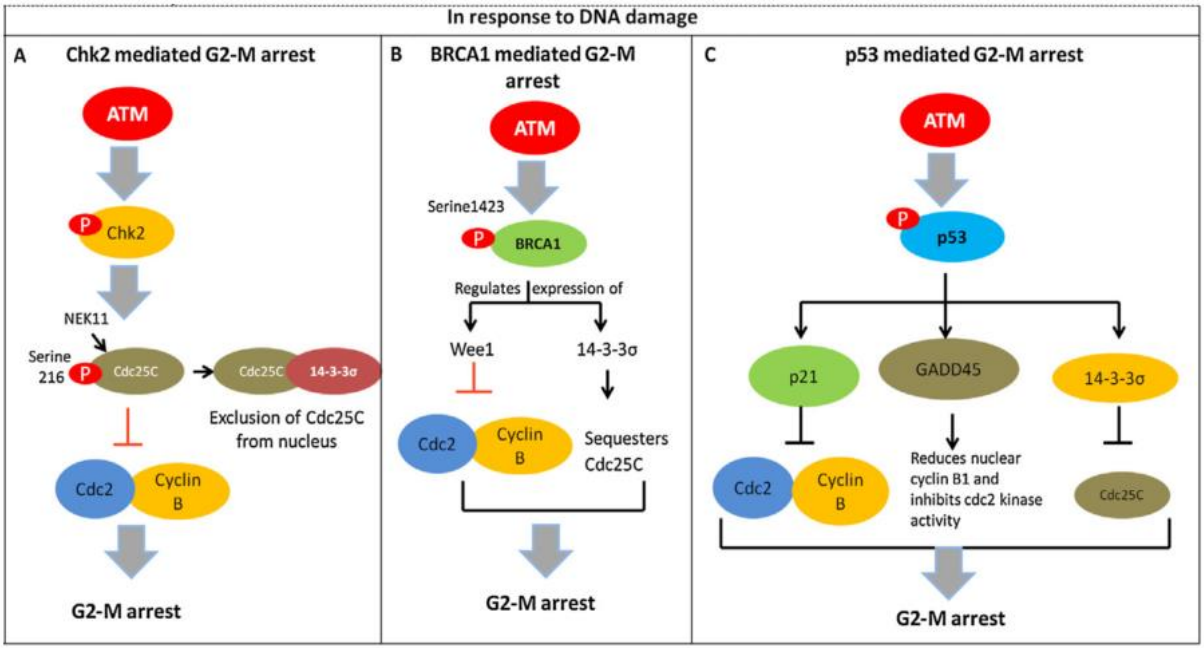
Po aktivaci ATM je do míst poškození rekrutováno množství proteinů angažovaných v opravách DNA. Mezi nimi i proteiny Tumor supresor p53-vazebný protein 1 (53BP1) a BRCA1 **(shrnuto v Bekker-Jensen & Mailand 2010)**. Oba tyto proteiny přispívají k aktivaci ATM skrz MRN komplex (Lee et al., 2010). BRCA1 je nutný pro aktivaci CHK1 kinázy (Yu and Chen, 2004) a reguluje expresi kinázy WEE1 a proteinu 14-3-3 (Yarden et al., 2002).

ATM fosforyluje transkripční faktor p53 na Ser15 (Maclaine and Hupp, 2009), což vede k jeho stabilizaci (Chehab et al., 1999). p53 indukuje transkripci mnoha genů, včetně genu pro protein 14-3-3, jehož exprese inhibuje přechod z G2 do mitózy (Hermeking et al., 1997), genu pro protein p21, který inhibuje komplex cyklin-CDK (Flatt et al., 2000). A nakonec genu pro protein Growth arrest and DNA damage-inducible alpha (GADD45), který brání jaderné akumulaci cyklinu B (Jin et al., 2002).

3.2.4. Role CHK2 v G2 kontrolním bodě

Mezi substráty ATM patří i CHK2, která je po IR fosforylována na Thr68, což je nutné pro její aktivaci (Ahn et al., 2000). Nedávno bylo ukázáno, že CHK2 je fosforylována na různých místech a s různou kinetikou v závislosti na druhu poškození, jakému buňka čelí, a dále, že fosforylace specifických zbytků ovlivňuje další modifikace proteinu (Ouchi and Ouchi, 2014). Aktivní CHK2 fosforyluje kromě dalších substrátů angažovaných v opravách DNA i proteiny, které zajišťují zastavení progrese buněčného cyklu. Jedná se o fosforylaci CDC25C na Ser216 (Matsuoka, 1998), což vede k její inhibici skrz akumulaci v cytoplasmě. Původně bylo také navrženo, že fosforylace CDC25A CHK2 kinázou vede k její destrukci (Falck et al., 2001), avšak to bylo později zpochybněno, když bylo ukázáno, že CHK2 není schopná fosforylovat CDC25A na Ser76 (Jin et al., 2008), který, jak již bylo zmíněno, je kritický pro ubiguitinylaci CDC25A (Jin et al., 2003), a že CHK2 není schopna indukovat ubiquitinylaci CDC25A. V souladu s tím buňky bez funkční CHK2 nevykazovaly defekty v degradaci CDC25A po IR (Jin et al., 2008).

Přes to, že CHK2 byla původně navržena v regulaci p53, na lidských buňkách rakoviny tlustého střeva HCT116 bylo ukázáno, že disrupce CHK2 nezpůsobuje defekty ani ve stabilizaci p53, ani v G2 kontrolním bodě (Jallepalli et al., 2003). To bylo potvrzeno i v další studii, ve které bylo navíc ukázáno, že poškození DNA neindukuje CHK2 k fosforylaci p53 a že in vitro p53 představuje špatný substrát pro CHK2 (Ahn et al., 2003). To vše naznačuje, že CHK2 hraje v indukci zastavení buněk v kontrolním bodě pouze vedlejší roli.



Obr. 4 Signalizace ATM

A: Po poškození DNA ATM aktivuje CHK2, která poté fosforyluje CDC25C na Ser216. To indukuje sekvestraci CDC25C a 14-3-3 v cytoplasmě. Eliminace CDC25C z jádra znemožňuje aktivaci cyklin B-CDK1 a vede k zastavení buňky v G2.

B: Po poškození DNA ATM fosforyluje BRCA1 na Ser1423. BRCA1 poté indukuje expresi Wee1, která vytváří inhibiční fosforylaci na CDK1 a expresi 14-3-3, který sekvestruje CDC25C v cytoplasmě. Oba tyto děje bráni vstupu buňky do mitózy.

C: ATM skrz p53 indukuje expresi proteinů p21, který inhibuje cyklin B-CDK1, 14-3-3, který sekvestruje CDC25C v cytoplasmě a GADD45, který indukuje exkluzi cyklinu B z jádra. Všechny tyto proteiny inhibují aktivity CDK1 přispívají k zastavení buněčného cyklu v G2.

Převzato a upraveno z (Guleria and Chandna, 2015).

Závěr

Správná regulace buněčného cyklu je klíčová pro přežití buňky a pro udržení integrity tkání. Pokud tato regulace selže a dělení je umožněno buňkám, ve kterých došlo k poškození DNA, mohou se v těchto buňkách hromadit mutace, které vedou ke vzniku buňky nádorové. Nádorové buňky mají schopnost se neomezeně dělit a to i bez přítomnosti většiny růstových faktorů, neodpovídají na signály pro ukončení dělení a jsou méně citlivé ke stimulům pro programovanou buněčnou smrt.

Za hlavní regulátory buněčného cyklu jsou považovány protein kinázy v součinnosti s proteiny cykliny. Avšak kroměináz hrají důležitou roli v regulaci buněčného cyklu i protein fosfatázy. Ty jsou schopné fosforylace vytvářené kinázami odstraňovat a tvoří tak jejich důležitý protipól. Důležitost fosfatáz dokládá to, že jejich deplece výrazně usnadňuje vstup buněk do mitózy.

V reakci na poškození DNA jsou aktivovány dráhy, které jsou rovněž regulovány protein kinázami a které zajišťují, aby buňky s poškozenou genetickou informací toto poškození buď opravily, nebo spustily programovanou buněčnou smrt. I v těchto procesech jsou důležitými antagonisty proteinináz protein fosfatázy, jejichž deplece je schopna spustit buněčnou odpověď na poškození DNA i bez přítomnosti tohoto poškození.

Protein kinázy tak spolu s fosfatázami tvoří složitou regulační síť, která zajišťuje správný postup buňky buněčným cyklem od chvíle jejího vzniku až po její rozdělení.

Kromě fosforylace se v poslední době ukazuje důležitost i dalších posttranslačních modifikací jako je SUMOylace, ubiquitinylace nebo acetylace. Tyto modifikace zprostředkovávají další proteinové interakce a regulační mechanismy odpovědi na poškození DNA. Avšak detaily jejich fungování bude nutné v budoucnu ještě zmapovat.

Literatura:

Ahn, J., Urist, M., and Prives, C. (2003). Questioning the role of checkpoint kinase 2 in the p53 DNA damage response. J. Biol. Chem. *278*, 20480–20489.

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.

Álvarez-Fernández, M., Sánchez-Martínez, R., Sanz-Castillo, B., Gan, P.P., Sanz-Flores, M., Trakala, M., Ruiz-Torres, M., Lorca, T., Castro, A., and Malumbres, M. (2013). Greatwall is essential to prevent mitotic collapse after nuclear envelope breakdown in mammals. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 17374–17379.

Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature *421*, 499–506.

Baldin, V., Cans, C., Superti-Furga, G., and Ducommun, B. (1997). Alternative splicing of the human CDC25B tyrosine phosphatase. Possible implications for growth control? Oncogene *14*, 2485–2495.

Bekker-Jensen, S., and Mailand, N. (2010). Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. DNA Repair (Amst). *9*, 1219–1228.

Blake-Hodek, K.A., Williams, B.C., Zhao, Y., Castilho, P. V., Chen, W., Mao, Y., Yamamoto, T.M., and Goldberg, M.L. (2012). Determinants for Activation of the Atypical AGC Kinase Greatwall during M Phase Entry. Mol. Cell. Biol. *32*, 1337–1353.

De Boer, L., Oakes, V., Beamish, H., Giles, N., Stevens, F., Somodevilla-Torres, M., Desouza, C., and Gabrielli, B. (2008). Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events. Oncogene *27*, 4261–4268.

Bonilla, C.Y., Melo, J.A., and Toczyski, D.P. (2008). Colocalization of sensors is sufficient to activate the DNA damage checkpoint in the absence of damage. Mol. Cell *30*, 267–276.

Booher, R.N., Holman, P.S., and Fattaey, A. (1997). Human Myt1 Is a Cell Cycle-regulated Kinase That Inhibits Cdc2 but Not Cdk2 Activity. J. Biol. Chem. *272*, 22300–22306.

Boutros, R., Dozier, C., and Ducommun, B. (2006). The when and wheres of CDC25 phosphatases. Curr. Opin. Cell Biol. *18*, 185–191.

Bruinsma, W., Macurek, L., Freire, R., Lindqvist, A., and Medema, R.H. (2014). Bora and Aurora-A continue to activate Plk1 in mitosis. J. Cell Sci. *127*, 801–811.

Busch, C., Barton, O., Morgenstern, E., Götz, C., Günther, J., Noll, A., and Montenarh, M. (2007). The G2/M checkpoint phosphatase cdc25C is located within centrosomes. Int. J. Biochem. Cell Biol. *39*, 1707–1713.

Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M., Walter, J.C., and Cimprich, K.A. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. Genes Dev. *19*, 1040–1052.

Castilho, P. V, Williams, B.C., Mochida, S., Zhao, Y., and Goldberg, M.L. (2009). The M phase kinase Greatwall (Gwl) promotes inactivation of PP2A/B55delta, a phosphatase directed against CDK phosphosites. Mol. Biol. Cell *20*, 4777–4789.

Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint

signaling. Science *294*, 1713–1716.

Cui, C., Ren, X., Liu, D., Deng, X., Qin, X., Zhao, X., Wang, E., and Yu, B. (2014). 14-3-3 epsilon prevents G2/M transition of fertilized mouse eggs by binding with CDC25B. BMC Dev. Biol. *14*, 33.

Daniel, J.A., Pellegrini, M., Lee, J.-H., Paull, T.T., Feigenbaum, L., and Nussenzweig, A. (2008). Multiple autophosphorylation sites are dispensable for murine ATM activation in vivo. J. Cell Biol. *183*, 777–783.

Delacroix, S., Wagner, J.M., Kobayashi, M., Yamamoto, K. -i., and Karnitz, L.M. (2007). The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. Genes Dev. *21*, 1472–1477.

Dupré, A., Boyer-Chatenet, L., and Gautier, J. (2006). Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. Nat. Struct. Mol. Biol. *13*, 451–457.

Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouché, J.-P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., et al. (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. J. Cell Sci. *117*, 2523–2531.

Elia, A.E.H., Cantley, L.C., and Yaffe, M.B. (2003). Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. Science *299*, 1228–1231.

Ellison, V., and Stillman, B. (2003). Biochemical characterization of DNA damage checkpoint complexes: clamp loader and clamp complexes with specificity for 5' recessed DNA. PLoS Biol. *1*, E33.

Enomoto, M., Goto, H., Tomono, Y., Kasahara, K., Tsujimura, K., Kiyono, T., and Inagaki, M. (2009). Novel positive feedback loop between Cdk1 and Chk1 in the nucleus during G2/M transition. J. Biol. Chem. *284*, 34223–34230.

Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R.G., Bartek, J., and Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. Nature *410*, 842–847.

Falck, J., Coates, J., and Jackson, S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. Nature *434*, 605–611.

Ferguson, A.M., White, L.S., Donovan, P.J., and 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.

Fisher, R.P., and Morgan, D.O. (1994). A novel cyclin associates with M015/CDK7 to form the CDK-activating kinase. Cell *78*, 713–724.

Flatt, P.M., Tang, L.J., Scatena, C.D., Szak, S.T., and Pietenpol, J.A. (2000). p53 regulation of G(2) checkpoint is retinoblastoma protein dependent. Mol. Cell. Biol. *20*, 4210–4223.

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.

Furuno, N., den Elzen, N., and Pines, J. (1999). Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. J. Cell Biol. *147*, 295–306.

Gabrielli, B., De Souza, C., Tonks, I., Clark, J., Hayward, N., and Ellem, K. (1996). Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. J. Cell Sci. *109*, 1081–1093.

Gabrielli, B.G., Clark, J.M., McCormack, A.K., and Ellem, K.A.O. (1997). Hyperphosphorylation of the

N-terminal Domain of Cdc25 Regulates Activity toward Cyclin B1/Cdc2 But Not Cyclin A/Cdk2. J. Biol. Chem. *272*, 28607–28614.

Gareau, J.R., and Lima, C.D. (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *11*, 861–871.

Gharbi-Ayachi, A., Labbé, J.-C., Burgess, A., Vigneron, S., Strub, J.-M., Brioudes, E., Van-Dorsselaer, A., Castro, A., and Lorca, T. (2010). The substrate of Greatwall kinase, Arpp19, controls mitosis by inhibiting protein phosphatase 2A. Science *330*, 1673–1677.

Giles, N., Forrest, A., and Gabrielli, B. (2003). 14-3-3 acts as an intramolecular bridge to regulate cdc25B localization and activity. J. Biol. Chem. *278*, 28580–28587.

Goodarzi, A.A., Jonnalagadda, J.C., Douglas, P., Young, D., Ye, R., Moorhead, G.B.G., Lees-Miller, S.P., and Khanna, K.K. (2004). Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. EMBO J. *23*, 4451–4461.

Guleria, A., and Chandna, S. (2015). ATM kinase: Much more than a DNA damage responsive protein. DNA Repair (Amst). *39*, 1–20.

Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S.X., and Dunphy, W.G. (2000). Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in Xenopus egg extracts. Genes Dev. *14*, 2745–2756.

Hamanaka, R., Smith, M.R., O'Connor, P.M., Maloid, S., Mihalic, K., Spivak, J.L., Longo, D.L., and Ferris, D.K. (1995). Polo-like Kinase Is a Cell Cycle-regulated Kinase Activated during Mitosis. J. Biol. Chem. *270*, 21086–21091.

Hara, M., Abe, Y., Tanaka, T., Yamamoto, T., Okumura, E., and Kishimoto, T. (2012). Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of M-phase-promoting factor. Nat. Commun. *3*, 1059.

Hégarat, N., Vesely, C., Vinod, P.K., Ocasio, C., Peter, N., Gannon, J., Oliver, A.W., Novák, B., and Hochegger, H. (2014). PP2A/B55 and Fcp1 regulate Greatwall and Ensa dephosphorylation during mitotic exit. PLoS Genet. *10*, e1004004.

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.

Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K., and Saya, H. (2003). Aurora-A and an Interacting Activator, the LIM Protein Ajuba, Are Required for Mitotic Commitment in Human Cells. Cell *114*, 585–598.

Chan, E.H.Y., Santamaria, A., Silljé, H.H.W., and Nigg, E.A. (2008). Plk1 regulates mitotic Aurora A function through betaTrCP-dependent degradation of hBora. Chromosoma *117*, 457–469.

Chehab, N.H., Malikzay, A., Stavridi, E.S., and Halazonetis, T.D. (1999). Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 13777–13782.

Chen, M.S., Hurov, J., White, L.S., Woodford-Thomas, T., and Piwnica-Worms, H. (2001). Absence of apparent phenotype in mice lacking Cdc25C protein phosphatase. Mol. Cell. Biol. *21*, 3853–3861.

Chen, M.-S., Ryan, C.E., and Piwnica-Worms, H. (2003). Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. Mol. Cell. Biol. *23*, 7488–7497.

Chen, P., Luo, C., Deng, Y., Ryan, K., Register, J., Margosiak, S., Tempczyk-Russell, A., Nguyen, B., Myers, P., Lundgren, K., et al. (2000). Implications for Chk1 Regulation: The 1.7 Å Crystal Structure of Human Cell Cycle Checkpoint Kinase Chk1. Cell *100*, 681–692.

Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E. a, and Pines, J. (2003). Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. Nat. Cell Biol. *5*, 143–148.

Jallepalli, P. V, Lengauer, C., Vogelstein, B., and Bunz, F. (2003). The Chk2 tumor suppressor is not required for p53 responses in human cancer cells. J. Biol. Chem. *278*, 20475–20479.

Jang, Y.-J., Lin, C.-Y., Ma, S., and Erikson, R.L. (2002). 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.

Janssens, V., Longin, S., and Goris, J. (2008). PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). Trends Biochem. Sci. *33*, 113–121.

Jin, J., Shirogane, T., Xu, L., Nalepa, G., Qin, J., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (2003). SCFbeta-TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. Genes Dev. *17*, 3062–3074.

Jin, J., Ang, X.L., Ye, X., Livingstone, M., and 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.

Jin, S., Tong, T., Fan, W., Fan, F., Antinore, M.J., Zhu, X., Mazzacurati, L., Li, X., Petrik, K.L., Rajasekaran, B., et al. (2002). GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity. Oncogene *21*, 8696–8704.

Källström, H., Lindqvist, A., Pospisil, V., Lundgren, A., and Rosenthal, C.K. (2005). Cdc25A localisation and shuttling: characterisation of sequences mediating nuclear export and import. Exp. Cell Res. *303*, 89–100.

Kasahara, K., Goto, H., Enomoto, M., Tomono, Y., Kiyono, T., and Inagaki, M. (2010). 14-3-3gamma mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. EMBO J. *29*, 2802–2812.

Kemp, M.G., Akan, Z., Yilmaz, S., Grillo, M., Smith-Roe, S.L., Kang, T.-H., Cordeiro-Stone, M., Kaufmann, W.K., Abraham, R.T., Sancar, A., et al. (2010). Tipin-replication protein A interaction mediates Chk1 phosphorylation by ATR in response to genotoxic stress. J. Biol. Chem. *285*, 16562–16571.

Kim, M.-Y., Bucciarelli, E., Morton, D.G., Williams, B.C., Blake-Hodek, K., Pellacani, C., Von Stetina, J.R., Hu, X., Somma, M.P., Drummond-Barbosa, D., et al. (2012). Bypassing the Greatwall-Endosulfine pathway: plasticity of a pivotal cell-cycle regulatory module in Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans. Genetics *191*, 1181–1197.

Kishimoto, T. (1994). Cell reproduction: Induction of M-phase events by cyclin-dependent cdc2 kinase. Int. J. Dev. Biol. *38*, 185–191.

Kishimoto, T. (2015). Entry into mitosis: a solution to the decades-long enigma of MPF. Chromosoma *124*, 417–428.

de Klein, A., Muijtjens, M., van Os, R., Verhoeven, Y., Smit, B., Carr, A.M., Lehmann, A.R., and Hoeijmakers, J.H.J. (2000). Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. Curr. Biol. *10*, 479–482.

Kosoy, A., and O'Connell, M.J. (2008). Regulation of Chk1 by its C-terminal domain. Mol. Biol. Cell *19*, 4546–4553.

Kozlov, S. V, Graham, M.E., Peng, C., Chen, P., Robinson, P.J., and Lavin, M.F. (2006). Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. EMBO J. *25*, 3504–3514.

Kozlov, S. V, Graham, M.E., Jakob, B., Tobias, F., Kijas, A.W., Tanuji, M., Chen, P., Robinson, P.J., Taucher-Scholz, G., Suzuki, K., et al. (2011). Autophosphorylation and ATM activation: additional sites add to the complexity. J. Biol. Chem. *286*, 9107–9119.

Kumagai, A., Kim, S.-M., and Dunphy, W.G. (2004). Claspin and the activated form of ATR-ATRIP collaborate in the activation of Chk1. J. Biol. Chem. *279*, 49599–49608.

Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H.Y., and Dunphy, W.G. (2006). TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. Cell *124*, 943–955.

Lammer, C., Wagerer, S., Saffrich, R., Mertens, D., Ansorge, W., and Hoffmann, I. (1998). The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. J. Cell Sci. *111*, 2445–2453.

Lee, J., and Dunphy, W.G. (2010). Rad17 plays a central role in establishment of the interaction between TopBP1 and the Rad9-Hus1-Rad1 complex at stalled replication forks. Mol. Biol. Cell *21*, 926–935.

Lee, J.-H., Goodarzi, A.A., Jeggo, P.A., and Paull, T.T. (2010). 53BP1 promotes ATM activity through direct interactions with the MRN complex. EMBO J. *29*, 574–585.

Lindqvist, A., Källström, H., Lundgren, A., Barsoum, E., and Rosenthal, C.K. (2005). Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. J. Cell Biol. *171*, 35–45.

Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V., and Medema, R.H. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. J. Cell Biol. *185*, 193–202.

Lindsey-Boltz, L.A., Bermudez, V.P., Hurwitz, J., and Sancar, A. (2001). Purification and characterization of human DNA damage checkpoint Rad complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 11236–11241.

Lindsey-Boltz, L.A., Serçin, O., Choi, J.-H., and Sancar, A. (2009). Reconstitution of human claspin-mediated phosphorylation of Chk1 by the ATR (ataxia telangiectasia-mutated and rad3-related) checkpoint kinase. J. Biol. Chem. *284*, 33107–33114.

Lindsey-Boltz, L.A., Kemp, M.G., Capp, C., and Sancar, A. (2015). RHINO forms a stoichiometric complex with the 9-1-1 checkpoint clamp and mediates ATR-Chk1 signaling. Cell Cycle *14*, 99–108.

Liu, F., Stanton, J.J., Wu, Z., and Piwnica-Worms, H. (1997). The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. Mol. Cell. Biol. *17*, 571–583.

Liu, F., Rothblum-Oviatt, C., Ryan, C.E., and Piwnica-Worms, H. (1999). Overproduction of Human Myt1 Kinase Induces a G 2 Cell Cycle Delay by Interfering with the Intracellular Trafficking of Cdc2-Cyclin B1 Complexes. Mol. Cell. Biol. *19*, 5113–5123.

Liu, J., Luo, S., Zhao, H., Liao, J., Li, J., Yang, C., Xu, B., Stern, D.F., Xu, X., and Ye, K. (2012). Structural mechanism of the phosphorylation-dependent dimerization of the MDC1 forkhead-associated domain. Nucleic Acids Res. *40*, 3898–3912.

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 G2/M DNA damage checkpoint. Genes & Dev. *14*, 1448–1459.

Liu, S., Shiotani, B., Lahiri, M., Maréchal, A., Tse, A., Leung, C.C.Y., Glover, J.N.M., Yang, X.H., and Zou, L. (2011). ATR autophosphorylation as a molecular switch for checkpoint activation. Mol. Cell *43*, 192–202.

Lopez-Girona, A., Tanaka, K., Chen, X.B., Baber, B.A., McGowan, C.H., and Russell, P. (2001). Serine-345 is required for Rad3-dependent phosphorylation and function of checkpoint kinase Chk1 in fission yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 11289–11294.

Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Wu, X., and Chen, J. (2003). MDC1 is coupled to activated CHK2 in mammalian DNA damage response pathways. Nature *421*, 957–961.

Lowery, D.M., Clauser, K.R., Hjerrild, M., Lim, D., Alexander, J., Kishi, K., Ong, S.-E., Gammeltoft, S., Carr, S.A., and Yaffe, M.B. (2007). Proteomic screen defines the Polo-box domain interactome and identifies Rock2 as a Plk1 substrate. EMBO J. *26*, 2262–2273.

MacDougall, C.A., Byun, T.S., Van, C., Yee, M., and Cimprich, K.A. (2007). The structural determinants of checkpoint activation. Genes Dev. *21*, 898–903.

Maclaine, N.J., and Hupp, T.R. (2009). The regulation of p53 by phosphorylation: a model for how distinct signals integrate into the p53 pathway. Aging (Albany. NY). *1*, 490–502.

Macůrek, L., Lindqvist, A., Voets, O., Kool, J., Vos, H.R., and Medema, R.H. (2010). Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gammaH2AX to promote checkpoint inhibition. Oncogene *29*, 2281–2291.

Mailand, N., Podtelejnikov, A. V, Groth, A., Mann, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2002). Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. EMBO J. *21*, 5911–5920.

Majka, J., Binz, S.K., Wold, M.S., and Burgers, P.M.J. (2006). Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. J. Biol. Chem. *281*, 27855–27861.

Mamely, I., van Vugt, M.A., Smits, V.A.J., Semple, J.I., Lemmens, B., Perrakis, A., Medema, R.H., and Freire, R. (2006). Polo-like kinase-1 controls proteasome-dependent degradation of Claspin during checkpoint recovery. Curr. Biol. *16*, 1950–1955.

Maréchal, A., and Zou, L. (2015). RPA-coated single-stranded DNA as a platform for post-translational modifications in the DNA damage response. Cell Res. *25*, 9–23.

Maréchal, A., Li, J.-M., Ji, X.Y., Wu, C.-S., Yazinski, S.A., Nguyen, H.D., Liu, S., Jiménez, A.E., Jin, J., and Zou, L. (2014). PRP19 transforms into a sensor of RPA-ssDNA after DNA damage and drives ATR activation via a ubiquitin-mediated circuitry. Mol. Cell *53*, 235–246.

Maser, R.S., Monsen, K.J., Nelms, B.E., and Petrini, J.H. (1997). hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. Mol. Cell. Biol. *17*, 6087–6096.

Matsuoka, S. (1998). Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase. Science (80-.). *282*, 1893–1897.

McGowan, C.H., and Russell, P. (1995). Cell cycle regulation of human WEE1. EMBO J. *14*, 2166–2175.

Melixetian, M., Klein, D.K., Sørensen, C.S., and Helin, K. (2009). NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint. Nat. Cell Biol. *11*, 1247–1253.

Mirzoeva, O.K., and Petrini, J.H. (2001). DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. Mol. Cell. Biol. *21*, 281–288.

Mochida, S. (2014). Regulation of α-endosulfine, an inhibitor of protein phosphatase 2A, by multisite phosphorylation. FEBS J. *281*, 1159–1169.

Mochida, S., Ikeo, S., Gannon, J., and Hunt, T. (2009). Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in Xenopus egg extracts. EMBO J. *28*, 2777–2785.

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.

Navadgi-Patil, V.M., and Burgers, P.M. (2009). The unstructured C-terminal tail of the 9-1-1 clamp subunit Ddc1 activates Mec1/ATR via two distinct mechanisms. Mol. Cell *36*, 743–753.

O'Connell, M.J., Raleigh, J.M., Verkade, H.M., and Nurse, P. (1997). Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. EMBO J. *16*, 545–554.

Okumura, E., Morita, A., Wakai, M., Mochida, S., Hara, M., and Kishimoto, T. (2014). Cyclin B-Cdk1 inhibits protein phosphatase PP2A-B55 via a Greatwall kinase-independent mechanism. J. Cell Biol. *204*, 881–889.

Ouchi, M., and Ouchi, T. (2014). Distinct DNA damage determines differential phosphorylation of Chk2. Cancer Biol. Ther. *15*, 1700–1704.

Pandita, T.K., Lieberman, H.B., Lim, D.S., Dhar, S., Zheng, W., Taya, Y., and Kastan, M.B. (2000). Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. Oncogene *19*, 1386–1391.

Parker, L., and Piwnica-Worms, H. (1992). Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. Science (80-.). *257*, 1955–1957.

Pellegrini, M., Celeste, A., Difilippantonio, S., Guo, R., Wang, W., Feigenbaum, L., and Nussenzweig, A. (2006). Autophosphorylation at serine 1987 is dispensable for murine Atm activation in vivo. Nature *443*, 222–225.

Peng, C. (1997). Mitotic and G2 Checkpoint Control: Regulation of 14-3-3 Protein Binding by Phosphorylation of Cdc25C on Serine-216. Science (80-.). *277*, 1501–1505.

Peng, A., Lewellyn, A.L., Schiemann, W.P., and Maller, J.L. (2010). Repo-man controls a protein phosphatase 1-dependent threshold for DNA damage checkpoint activation. Curr. Biol. *20*, 387–396.

Pines, J., and Hunter, T. (1991). Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. J. Cell Biol. *115*, 1–17.

Post, S., Weng, Y.C., Cimprich, K., Chen, L.B., Xu, Y., and Lee, E.Y. (2001). Phosphorylation of serines 635 and 645 of human Rad17 is cell cycle regulated and is required for G(1)/S checkpoint activation in response to DNA damage. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 13102–13107.

Qian, Y.W., Erikson, E., and Maller, J.L. (1999). Mitotic effects of a constitutively active mutant of the Xenopus polo-like kinase Plx1. Mol. Cell. Biol. *19*, 8625–8632.

Rogers, S., Fey, D., McCloy, R.A., Parker, B.L., Mitchell, N.J., Payne, R.J., Daly, R.J., James, D.E., Caldon,

C.E., Watkins, D.N., et al. (2016). PP1 initiates the dephosphorylation of MASTL, triggering mitotic exit and bistability in human cells. J. Cell Sci. *129*, 1340–1354.

Sanchez, Y. (1997). Conservation of the Chk1 Checkpoint Pathway in Mammals: Linkage of DNA Damage to Cdk Regulation Through Cdc25. Science (80-.). *277*, 1497–1501.

Savic, V., Yin, B., Maas, N.L., Bredemeyer, A.L., Carpenter, A.C., Helmink, B.A., Yang-Iott, K.S., Sleckman, B.P., and Bassing, C.H. (2009). Formation of dynamic gamma-H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin. Mol. Cell *34*, 298–310.

Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., et al. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. Science (80-.). *268*, 1749–1753.

Seki, A., Coppinger, J.A., Jang, C.-Y., Yates, J.R., and Fang, G. (2008a). Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. Science *320*, 1655–1658.

Seki, A., Coppinger, J.A., Du, H., Jang, C.-Y., Yates, J.R., and Fang, G. (2008b). Plk1- and beta-TrCP-dependent degradation of Bora controls mitotic progression. J. Cell Biol. *181*, 65–78.

Shackelford, R.E., Kaufmann, W.K., and Paules, R.S. (1999). Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. Environ. Health Perspect. *107 Suppl* , 5–24.

Shiotani, B., and Zou, L. (2009). Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. Mol. Cell *33*, 547–558.

Shreeram, S., Demidov, O.N., Hee, W.K., Yamaguchi, H., Onishi, N., Kek, C., Timofeev, O.N., Dudgeon, C., Fornace, A.J., Anderson, C.W., et al. (2006). Wip1 phosphatase modulates ATM-dependent signaling pathways. Mol. Cell *23*, 757–764.

So, S., Davis, A.J., and Chen, D.J. (2009). Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites. J. Cell Biol. *187*, 977–990.

Solomon, M.J., Lee, T., and Kirschner, M.W. (1992). Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. Mol. Biol. Cell *3*, 13–27.

De Souza, C.P., Ellem, K.A., and Gabrielli, B.G. (2000). Centrosomal and cytoplasmic Cdc2/cyclin B1 activation precedes nuclear mitotic events. Exp. Cell Res. *257*, 11–21.

St Onge, R.P., Besley, B.D.A., Pelley, J.L., and Davey, S. (2003). A role for the phosphorylation of hRad9 in checkpoint signaling. J. Biol. Chem. *278*, 26620–26628.

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.., and Taylor, A.M.R. (1999). The DNA Double-Strand Break Repair Gene hMRE11 Is Mutated in Individuals with an Ataxia-Telangiectasia-like Disorder. Cell *99*, 577–587.

Strausfeld, U., Fernandez, A., Capony, J.P., Girard, F., Lautredou, N., Derancourt, J., Labbe, J.C., and Lamb, N.J. (1994). Activation of p34cdc2 protein kinase by microinjection of human cdc25C into mammalian cells. Requirement for prior phosphorylation of cdc25C by p34cdc2 on sites phosphorylated at mitosis. J. Biol. Chem. *269*, 5989–6000.

Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. Cell *123*, 1213–1226.

Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N., and Price, B.D. (2005). A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 13182–13187.

Sun, Y., Xu, Y., Roy, K., and Price, B.D. (2007). DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. Mol. Cell. Biol. *27*, 8502–8509.

Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrapetov, M.K., Moreau, L.A., Whetstine, J.R., and Price, B.D. (2009). Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. Nat. Cell Biol. *11*, 1376–1382.

Tibelius, A., Marhold, J., Zentgraf, H., Heilig, C.E., Neitzel, H., Ducommun, B., Rauch, A., Ho, A.D., Bartek, J., and Krämer, A. (2009). Microcephalin and pericentrin regulate mitotic entry via centrosome-associated Chk1. J. Cell Biol. *185*, 1149–1157.

Timofeev, O., Cizmecioglu, O., Hu, E., Orlik, T., and Hoffmann, I. (2009). Human Cdc25A phosphatase has a non-redundant function in G2 phase by activating Cyclin A-dependent kinases. FEBS Lett. *583*, 841–847.

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.

Tsurimoto, T., and Stillman, B. (1991). Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. I. DNA structure-specific recognition of a primer-template junction by eukaryotic DNA polymerases and their accessory proteins. J. Biol. Chem. *266*, 1950–1960.

Upadhya, S., and Hegde, A. (2005). Ubiquitin-Proteasome Pathway Components as Therapeutic Targets for CNS Maladies. Curr. Pharm. Des. *11*, 3807–3828.

Van, C., Yan, S., Michael, W.M., Waga, S., and Cimprich, K.A. (2010). Continued primer synthesis at stalled replication forks contributes to checkpoint activation. J. Cell Biol. *189*, 233–246.

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.

Venclovas, C., and Thelen, M.P. (2000). Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes. Nucleic Acids Res. *28*, 2481–2493.

Vigneron, S., Gharbi-Ayachi, A., Raymond, A.-A., Burgess, A., Labbé, J.-C., Labesse, G., Monsarrat, B., Lorca, T., and Castro, A. (2011). Characterization of the mechanisms controlling Greatwall activity. Mol. Cell. Biol. *31*, 2262–2275.

Voets, E., and Wolthuis, R.M.F. (2010). MASTL is the human orthologue of Greatwall kinase that facilitates mitotic entry, anaphase and cytokinesis. Cell Cycle *9*, 3591–3601.

van Vugt, M.A.T.M., van de Weerdt, B.C.M., Vader, G., Janssen, H., Calafat, J., Klompmaker, R., Wolthuis, R.M.F., and Medema, R.H. (2004). 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.

Walker, M., Black, E.J., Oehler, V., Gillespie, D.A., and Scott, M.T. (2009). Chk1 C-terminal regulatory phosphorylation mediates checkpoint activation by de-repression of Chk1 catalytic activity. Oncogene *28*, 2314–2323.

Wang, J., Han, X., and Zhang, Y. (2012). Autoregulatory mechanisms of phosphorylation of checkpoint kinase 1. Cancer Res. *72*, 3786–3794.

Wang, Q., Goldstein, M., Alexander, P., Wakeman, T.P., Sun, T., Feng, J., Lou, Z., Kastan, M.B., and Wang, X.-F. (2014). Rad17 recruits the MRE11-RAD50-NBS1 complex to regulate the cellular response to DNA double-strand breaks. EMBO J. *33*, 862–877.

Wang, X., Zou, L., Lu, T., Bao, S., Hurov, K.E., Hittelman, W.N., Elledge, S.J., and Li, L. (2006). Rad17 phosphorylation is required for claspin recruitment and Chk1 activation in response to replication stress. Mol. Cell *23*, 331–341.

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.

Wells, N., Watanabe, N., Tokusumi, T., Jiang, W., Verdecia, M., 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.

Williams, B.C., Filter, J.J., Blake-Hodek, K.A., Wadzinski, B.E., Fuda, N.J., Shalloway, D., and Goldberg, M.L. (2014). Greatwall-phosphorylated Endosulfine is both an inhibitor and a substrate of PP2A-B55 heterotrimers. Elife *3*, e01695.

Wood, R.D., Mitchell, M., Sgouros, J., and Lindahl, T. (2001). Human DNA repair genes. Science *291*, 1284–1289.

Wu, C.-S., Ouyang, J., Mori, E., Nguyen, H.D., Maréchal, A., Hallet, A., Chen, D.J., and Zou, L. (2014). SUMOylation of ATRIP potentiates DNA damage signaling by boosting multiple protein interactions in the ATR pathway. Genes Dev. *28*, 1472–1484.

Wu, L., Luo, K., Lou, Z., and Chen, J. (2008). MDC1 regulates intra-S-phase checkpoint by targeting NBS1 to DNA double-strand breaks. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 11200–11205.

Xiao, J., Liu, C., Hou, J., Cui, C., Wu, D., Fan, H., Sun, X., Meng, J., Yang, F., Wang, E., et al. (2011). Ser149 is another potential PKA phosphorylation target of Cdc25B in G2/M transition of fertilized mouse eggs. J. Biol. Chem. *286*, 10356–10366.

Xu, N., Hegarat, N., Black, E.J., Scott, M.T., Hochegger, H., and Gillespie, D.A. (2010). Akt/PKB suppresses DNA damage processing and checkpoint activation in late G2. J. Cell Biol. *190*, 297–305.

Yarden, R.I., Pardo-Reoyo, S., Sgagias, M., Cowan, K.H., and Brody, L.C. (2002). BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. Nat. Genet. *30*, 285–289.

Yoo, H.Y., Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Dunphy, W.G. (2007). Ataxia-telangiectasia mutated (ATM)-dependent activation of ATR occurs through phosphorylation of TopBP1 by ATM. J. Biol. Chem. *282*, 17501–17506.

Yu, X., and 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.

Yu, J., Zhao, Y., Li, Z., Galas, S., and Goldberg, M.L. (2006). Greatwall kinase participates in the Cdc2 autoregulatory loop in Xenopus egg extracts. Mol. Cell *22*, 83–91.

Yu, X., Chini, C.C.S., He, M., Mer, G., and Chen, J. (2003). The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. Science *302*, 639–642.

Yuan, J., and Chen, J. (2010). MRE11-RAD50-NBS1 complex dictates DNA repair independent of H2AX. J. Biol. Chem. *285*, 1097–1104.

Zhang, H., Head, P.E., Daddacha, W., Park, S.-H., Li, X., Pan, Y., Madden, M.Z., Duong, D.M., Xie, M., Yu, B., et al. (2016). ATRIP Deacetylation by SIRT2 Drives ATR Checkpoint Activation by Promoting Binding to RPA-ssDNA. Cell Rep. *14*, 1435–1447.

Zhang, Y.-W., Otterness, D.M., Chiang, G.G., Xie, W., Liu, Y.-C., Mercurio, F., and Abraham, R.T. (2005). Genotoxic stress targets human Chk1 for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. Mol. Cell *19*, 607–618.

Zhang, Y.-W., Brognard, J., Coughlin, C., You, Z., Dolled-Filhart, M., Aslanian, A., Manning, G., Abraham, R.T., and Hunter, T. (2009). The F box protein Fbx6 regulates Chk1 stability and cellular sensitivity to replication stress. Mol. Cell *35*, 442–453.

Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. Science *300*, 1542–1548.

Zou, L., Cortez, D., and Elledge, S.J. (2002). Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. Genes Dev. *16*, 198–208.