

Université de Montréal

# **Localisation et fonction de CHK2 en mitose**

par

Guillaume Chouinard

Programmes de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc  
en Biologie moléculaire

29 Octobre 2012

© Guillaume Chouinard, 2012

## RÉSUMÉ

Les centrosomes dont le rôle principal est d'organiser le cytosquelette de microtubules et le fuseau mitotique servent aussi de sites d'interaction pour plusieurs protéines régulatrices du cycle cellulaire et de la réponse aux dommages à l'ADN. Une de ces protéines est la kinase CHK2 et plusieurs publications montrent une sous-population de CHK2 localisée aux centrosomes dans les cellules en interphase et en mitose. Toutefois, la localisation de CHK2 aux centrosomes demeure controversée, car des doutes subsistent en ce qui concerne la spécificité des anticorps utilisés en immunocytochimie. En utilisant des lignées cellulaires du cancer du côlon, les cellules HCT116 sauvages et HCT116 CHK2<sup>-/-</sup> ainsi que différentes lignées d'ostéosarcome humain dans lesquelles l'expression de CHK2 a été inhibée par ARN interférence, nous montrons que les anticorps anti-CHK2 qui donnent un signal centrosomal sont non spécifiques et reconnaissent un antigène inconnu sur les centrosomes. Cependant, par des expériences d'immunofluorescence réalisées avec des cellules U2OS qui expriment les protéines de fusion GFP-CHK2 ou FLAG-CHK2, nous révélons une localisation centrosomale de CHK2 dans les cellules en mitose, mais pas en interphase. Ce résultat a été confirmé par vidéomicroscopie dans les cellules vivantes exprimant GFP-CHK2. Pour déterminer le ou les rôles potentiels de CHK2 en mitose nous avons réalisé des expériences pour explorer le rôle de CHK2 dans la progression de la mitose, la nucléation des microtubules aux centrosomes et la progression de la mitose en présence de problèmes d'attachement des chromosomes où de lésions génotoxiques. Nos données suggèrent que CHK2 n'est pas impliquée dans la régulation de la mitose dans les cellules U2OS.

**Mots-clés :** CHK2, mitose, centrosomes, cycle cellulaire.

## ABSTRACT

Centrosomes function primarily as microtubule-organizing centres and play a crucial role during mitosis by organizing the bipolar spindle. In addition to this function, centrosomes act as reaction centers where numerous key regulators meet to control cell cycle progression. One of these factors involved in genome stability, the checkpoint kinase CHK2, was shown to localize at centrosomes throughout the cell cycle. Here, we clarify that CHK2 only localized at centrosomes during mitosis. Using wild-type and CHK2<sup>-/-</sup> HCT116 human colon cancer cells, or human osteosarcoma U2OS cells depleted for CHK2 with small hairpin RNAs, we show that several CHK2 antibodies are non-specific for immunofluorescence and cross-react with an unknown centrosomal protein(s). To analyse further CHK2 localization, we established cells expressing inducible GFP-CHK2 and Flag-CHK2 fusion proteins. We show that CHK2 localizes to the nucleus in interphase cells but that a fraction of CHK2 associates with centrosomes in mitotic cells, from early mitotic stages until cytokinesis. In contrast to previous data obtained by A. Stolz and colleagues with the human colon carcinoma HCT116 cell line, our experiments exploring the possible functions for CHK2 during mitosis did not support a role for CHK2 in the bipolar spindle formation and the timely progression of mitosis in human osteosarcoma U2OS cells.

**Keywords** : CHK2, mitosis, centrosomes, cell cycle.

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	ii
ABSTRACT .....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	iv
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS .....	ix
REMERCIEMENTS .....	xv
INTRODUCTION .....	1
La réponse cellulaire aux dommages à l'ADN (RDA).....	1
Nature des dommages à l'ADN .....	3
La détection des dommages à l'ADN .....	3
Les voies de transduction de la réponse aux dommages à l'ADN .....	4
Le cycle cellulaire .....	10
Les phases du cycle cellulaire .....	12
Régulation du cycle cellulaire.....	15
La Mitose .....	18
Description .....	18
Régulation de l'entrée en mitose.....	19
Points de contrôle du cycle cellulaire.....	23
Le point de contrôle à la transition G <sub>1</sub> /S.....	26
Le point de contrôle Intra-S .....	28
Le point de contrôle à la transition G <sub>2</sub> /M.....	29
Le point de contrôle en mitose ou « spindle assembly checkpoint » (SAC).....	32
Les points de contrôle du cycle cellulaire et le cancer .....	37
La kinase CHK2.....	38
CHK2 et le cancer .....	39
Structure et activation de CHK2 .....	40
Fonctions et substrats de CHK2.....	42
Les centrosomes .....	45

Anatomie et structure du centrosome.....	45
Le cycle de duplication des centrosomes .....	47
Les centrosomes et la régulation de l'entrée en mitose.....	49
Les centrosomes et le cancer.....	49
Signalisation croisée entre la réponse aux dommages à l'ADN et la mitose.....	50
La réponse des cellules aux dommages à l'ADN en mitose.....	51
Problématiques et objectifs .....	54
ARTICLE.....	56
ABSTRACT .....	57
INTRODUCTION .....	58
RESULTS AND DISCUSSION .....	60
CHK2 is localized in the nucleus but not at the centrosomes in interphase cells .....	60
CHK2 localizes at the centrosomes in mitotic cells.....	62
Polo-like kinase 1 is required for CHK2 localization at centrosomes .....	64
CHK2 function in mitotic cells .....	65
FIGURES .....	68
Figure 1. Centrosomes stain positive for CHK2 in human colon cancer cells deficient in CHK2. ....	68
Figure 2. Centrosomal staining for CHK2 antibodies persists in cells expressing CHK2 targeting shRNAs.....	69
Figure 3. CHK2 localizes at centrosomes in mitotic cells but not in interphase. ....	70
Figure 4. GFP-CHK2 localizes at centrosomes and spindle in mitotic living cells.....	71
Figure 5. Polo kinase 1 is required for CHK2 localization at centrosomes. ....	72
Supplementary Figure 1. The exogenous GFP-CHK2 and Flag-CHK2 fusion proteins are functional kinases.....	73
Supplementary Figure 2. During mitosis the localisation of CHK2 at the centrosomes is microtubules independent.....	73
Supplementary Figure 3. GFP, GFP-CHK1 and Flag-CHK1 do not localize at the centrosomes.....	74

Supplementary Figure 4. Depletion of Chk2 does not alter progression of cell through mitosis. ....	75
Supplementary Figure 5. ....	76
LEGENDS .....	77
Figure 1. ....	77
Figure 2. ....	77
Figure 3. ....	78
Figure 4. ....	79
Figure 5. ....	79
Supplementary Figure 1. ....	80
Supplementary Figure 2. ....	80
Supplementary Figure 3. ....	81
Supplementary Figure 4. ....	81
Supplementary Figure 5. ....	82
Supplementary Movies. ....	82
MATERIALS AND METHODS .....	83
Cells culture and Reagents. ....	83
Generation of U2OS cell lines. ....	83
RNA interference. ....	84
Immunofluorescence microscopy. ....	85
Western Blotting. ....	86
Time-lapse microscopy. ....	86
Determination of the kinetics of mitotic exit. ....	87
Microtubule regrowth assay. ....	87
ACKNOWLEDGEMENTS .....	88
ABBREVIATIONS .....	88
DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST .....	88
REFERENCES .....	88
DISCUSSION .....	94
La localisation centrosomale de CHK2 remise en question. ....	94

Localisation de CHK2 en interphase.....	94
Localisation de CHK2 dans les cellules en Mitose.....	98
Fonctions potentielles de CHK2 en mitose.....	102
PERSPECTIVES .....	107
CONCLUSION.....	110
BIBLIOGRAPHIE .....	111

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Organisation des voies de la réponse aux dommages à l'ADN.....	2
Figure 2 : Signalisation de la réponse aux dommages à l'ADN. ....	5
Figure 3 : Le cycle cellulaire.....	11
Figure 4 : La mitose. ....	14
Figure 5 : Régulation du cycle cellulaire par les complexes Cdk-Cycline. ....	16
Figure 6 : Régulation de l'entrée en mitose. ....	20
Figure 7 : Les points de contrôle du cycle cellulaire. ....	25
Figure 8 : Signalisation du point de contrôle à la transition G <sub>1</sub> /S.....	27
Figure 9 : Signalisation du point de contrôle intra-S. ....	29
Figure 10 : Signalisation du point de contrôle à la transition G <sub>2</sub> /M.....	31
Figure 11 : Modes d'attachement des chromatides sœurs en mitose. ....	33
Figure 12 : Régulation moléculaire du point de contrôle en mitose (SAC).....	36
Figure 13 : Structure et activation de la kinase CHK2.....	41
Figure 14 : Fonctions et substrats de CHK2. ....	44
Figure 15 : Structure du centrosome. ....	46
Figure 16 : Cycle de duplication des centrosomes.....	48
Figure 17 : Réponses cellulaires aux dommages à l'ADN en mitose. ....	53



## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

6-4PP	6-4 photoproduct
A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AKAP450	A kinase-anchoring protein 450
Akt	Acute killer T-cell
APC/C	Anaphase-Promoting Complex / Cyclosome
ATM	Ataxia-Telangiectasia mutated
ATR	Ataxia-Telangiectasia mutated and Rad3-related
B-Myb	Myeloblastosis transcription factor B
Bora	Aurora Borealis
bp	base pair
BRCA	Breast Cancer protein
BSA	Bovine serum albumin
Bub	Budding uninhibited by benomyl 1/2
BubR1	Budding uninhibited by benzimidazole related 1
C	Cytosine
CAK	Cdk-activating kinase
Ccdc151	Coiled coil domain containing 151
CDBs	Cassures double-brin
CDC	Cell division cycle
Cdk	Cyclin-dependant kinase
Cep63	Centrosomal protein 63kDa
Chk	Checkpoint Kinase
CIN	Chromosomal instability
Cip/Kip	CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein
CK2	Casein Kinase 2
CKIs	Cdk Inhibitors
CMV	Cytomegalovirus

CPD	Cyclo-butyl pyrimidine dimer
CSBs	Cassures simple brin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNApol $\alpha$	DNA polymerase $\alpha$
E2F	E2 transcription factor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ES	Embryonic stem cells
FANCD2	Fanconi anaemia complementation group D2
FCS	Fetal calf serum
FHA	Forkhead associated domain
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FoxM1	Forkhead box M1
G	Guanine
GADD45	Growth arrest and DNA-damage inducible 45 alpha
GFP	Green fluorescent protein
GSK3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$
H3K4me3	Histone H3 tri-méthylée sur la lysine 4
H3K9me3	Histone H3 tri-méthylée sur la lysine 9
H3pS10	HistoneH3 phosphorylée sur la serine 10
HA	Hémagglutinine
HCT116	Human colorectal carcinoma 116 cell line
HEK293T	Human embryonic kidney 293 large T SV-40 antigen
HP1 $\beta$	Heterochromatin protein 1 $\beta$
HR	Homologus recombinaison
IF	Immunofluorescence
INK4	Inhibitors of CDK4
IR	$\gamma$ Irradiation
kDa	Kilodalton
Kt	Kinétochore

Mad	Mitosis-arrest deficient
MAPKAPK-2	Mitogen activated protein kinase activated protein kinase 2
MCC	Mitotic checkpoint complex
MEK	MAPK/ERK Kinase
MLL	Mixed lineage leukemia protein
MPC	Matrice péricentriolaire
MPF	Mitosis-promoting factor
Mps1	Monopolar spindle 1
MRN	Mre11, Rad50, Nbs1
Mt	Microtubule
MTOC	Microtubule organizing centers
Myc	Myelocytomatosis virus
Myt1	Myelin Transcription Factor 1
NA	Numerical aperture
NaF	Sodium Fluoride
Nbs1	Nijmegen breakage syndrome 1
NER	Nucleotide excision repair
NF-Y	Background nuclear factor Y
NHEJ	Non-homologous end joining
NuRD	Nucleosome remodeling and deacetylase
ORF	Open reading frame
PACT	Pericentrin-AKAP450-centrosome targeting
PAR	Poly-(ADP-Ribose)
PBIP1	Polo box interacting protein 1
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferation cell nuclear antigen
PFA	Paraformaldéhyde
PI	Propidium iodine
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
Plk1	Polo-like kinase 1

PML	Promyelocytic leucemia protein
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PP1	Protein phosphatase 1
Puro	Puromycine
Q	Glutamine
Raf-1	Rapidly accelerated fibrosarcoma-1
Ras	Rat sarcoma
RDA	Réponse aux dommages à l'ADN
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RNF	Ring finger protein 8
ROS	Reactive oxygen species
S	Serine
SAC	Spindle assembly checkpoint
SAPK	Stress-activated protein kinase
SCD	SQ/TQ cluster domain
SCF	Skp1, Cullin, F-Box
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamide gel electrophoresis
Ser	Serine
shRNA	small hairpin RNAs
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2
SMC1	Structural maintenance of chromosomes protein
ssDNA	Single stranded DNA
T	Threonine
T	Thymidine
TAO	Thousand and one
Tet	Tetracycline
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
Thr	Threonine

Tip60	60 kDa Tat-interactive protein
TO	Tet-Off
U2OS	U2-Osteosarcoma
UTR	Untranslated regions
UV	Ultraviolet
VDAC	Voltage-dependant anion channel
wt	Wild type
Y	Tyrosine
$\beta$ -TRCP	$\beta$ -transducin repeat-containing <i>protein</i>
$\gamma$ -IR	Gamma irradiation
$\gamma$ -TuRC	$\gamma$ -Tubulin ring complex

*À ceux et celles, ils sauront se reconnaître,  
sur qui j'ai pu compter pendant ces deux  
années de dur labeur et de réconciliation  
avec le passé.*

*Également, à tous ceux et celles pour qui la  
recherche est devenue un acte de liberté, une  
manifestation élevée et sensible de l'esprit.*

## REMERCIEMENTS

Merci à toi Estelle, premier témoin de cette aventure pleine de rebondissements, empreinte d'émotions et basée sur une relation de confiance et de complicité qui me sera impossible à retrouver ailleurs. Mes aventures de la vie se poursuivront, mais ces cinq années de bonheur à travailler avec toi demeureront là, tout près de mon cœur. Merci pour tout !

Merci à ma famille et amis, qui tout au long de ce périple m'ont supporté et écouté quand j'en ai eu besoin. J'ai la chance d'être entouré de personnes extraordinaires et à tous je dis un GROS merci d'être présents dans ma vie !

Le mot final, je l'ai réservé pour quelqu'un de spécial, qui réussit à me rendre heureux depuis maintenant 6 ans... Merci à toi ma Élise, ma blonde, mon amour, qui de patience et à force d'encouragements m'a compris, aidé et motivé à donner le meilleur de moi-même.

# INTRODUCTION

La protéine CHK2 (Checkpoint Kinase 2) est une sérine-thréonine kinase importante dans la réponse cellulaire aux stress génotoxiques. Elle y tient un rôle central en agissant comme intégrateur des signaux de la réponse des cellules aux dommages à l'ADN [1]. CHK2 a de plus été localisée aux centrosomes, mais le rôle de cette sous-population centrosomale est demeuré inexploré [2]. Plus récemment, un nouveau rôle pour CHK2 au cours du cycle cellulaire normal et plus particulièrement en mitose a suggéré [3]. Le travail présenté dans ce mémoire a tenté de confirmer la localisation centrosomale d'une sous-population de CHK2 et a exploré la possibilité d'un rôle dans la régulation de la mitose.

Comme CHK2 est un constituant majeur de la réponse aux dommages à l'ADN (RDA), une description de la RDA, des points de contrôle du cycle cellulaire ainsi que de la place de ces mécanismes dans une perspective de cancer seront abordés. Ensuite, puisqu'un rôle en mitose a récemment été suggéré pour CHK2, la mitose et la place qu'y tiennent les kinases CHK2 et CHK1 seront décrits. Ultérieurement, la structure, la fonction et les rôles spécifiques de CHK2 seront décrits plus en détail. Finalement, les centrosomes qui tiennent un rôle de premier plan dans la régulation de la mitose seront discutés.

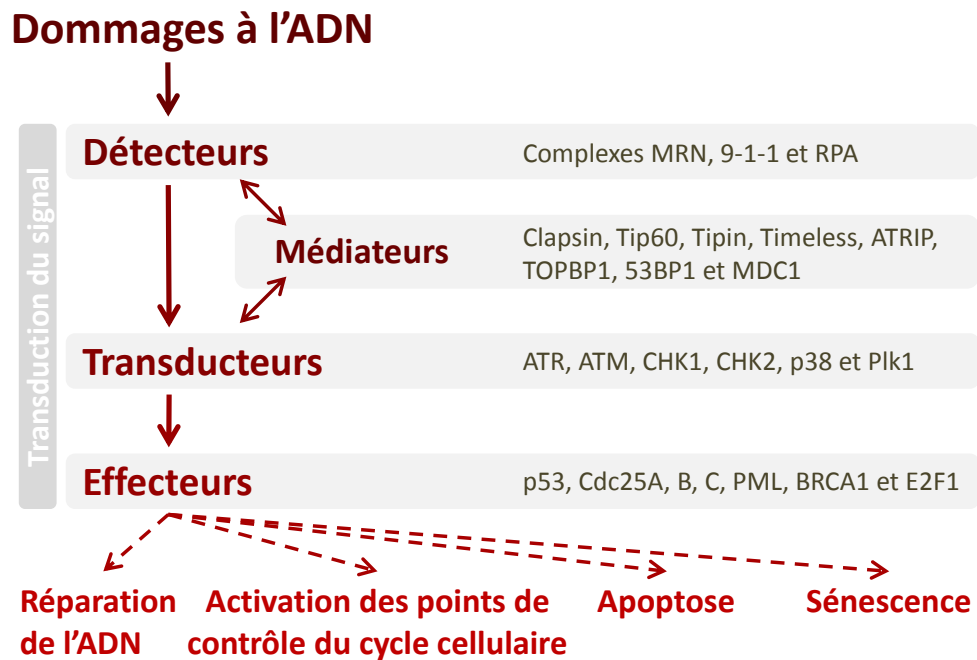
## **La réponse cellulaire aux dommages à l'ADN (RDA)**

Tout au long de leur existence, les cellules doivent gérer les stress génotoxiques qui menacent leur intégrité génomique. Elles ont conséquemment développé des mécanismes moléculaires qui suite à des dommages à l'ADN peuvent conduire à des réponses variées telles que l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose ou la sénescence [4]. La réponse cellulaire aux dommages à l'ADN (RDA) met en œuvre une mécanique cellulaire complexe qui voit au maintien de l'intégrité génomique et revêt d'une importance capitale en prévenant l'accumulation de mutations géniques, les réarrangements chromosomiques et l'aneuploïdie qui conduisent à des dysfonctionnements cellulaires et éventuellement au développement tumoral [5, 6].

Les multiples protéines impliquées dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN peuvent être classifiées selon leur rôle et leur position dans les cascades de



signalisations qui émergent des sites endommagés de l'ADN. Cette classification, illustrée à la Figure 1, regroupe les protéines selon leurs fonctions et leur séquence d'activation. Les dommages sont relevés par des « détecteurs », qui signalent l'anomalie génétique. Ces derniers, à l'aide des « médiateurs » qui modulent leur activité, activent les « transducteurs » qui relaient le signal aux « effecteurs ». Ce sont les effecteurs qui, en agissant sur leurs substrats, permettent des réponses appropriées telles que l'arrêt de la progression des cellules dans le cycle cellulaire, l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN et/ou les voies d'activation de la mort cellulaire si les dommages sont trop importants [7-10].



*Adaptation de Niida, H. et al. 2006*

**Figure 1 : Organisation des voies de la réponse aux dommages à l'ADN.**

Les protéines de la réponse aux dommages à l'ADN peuvent être classées selon leur rôle dans la signalisation des dommages. Les protéines détectrices (complexes MRN et 9-1-1) sont recrutées aux sites de lésions et sont responsables de l'activation des kinases transductrices ATM, ATM, CHK2, CHK1, p38 et Plk1. Ces protéines transductrices sont responsables de l'activation des protéines effectrices p53, Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C, BRCA1, E2F1 et PML qui sont à l'origine des réponses cellulaires. Ces réponses incluent la réparation de l'ADN, l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et la sénescence. Les médiateurs sont des protéines qui participent à l'activation des détecteurs et des transducteurs.

## **Nature des dommages à l'ADN**

Les dommages à l'ADN peuvent être d'origine intrinsèque ou extrinsèque et de nature variée. Les dommages d'origine intrinsèque sont principalement dus aux espèces réactives de l'oxygène ou ROS (reactive oxygen species), générées par la respiration cellulaire [11]. Les ROS réagissent rapidement avec les protéines et les acides nucléiques du milieu cellulaire générant ainsi des stress protéotoxiques et génotoxiques. Les protéines endommagées sont dégradées et recyclées alors que l'ADN endommagé va initier différentes réponses cellulaires incluant l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation des lésions de l'ADN et l'activation de l'apoptose si nécessaire. Les dommages extrinsèques sont causés par des agents exogènes tels que le rayonnement ultraviolet (UV), les radiations ionisantes et les agents chimiques mutagènes. Le rayonnement UV, en rencontrant les bases pyrimidiques thymidine et cytosine de l'ADN, induit plusieurs types de dommages dont les deux principaux sont les 6-4 photoproduits (6-4PPs) et les anneaux cycliques cyclobutyl-pyrimidines (CPDs). Ces structures aberrantes de l'ADN bloquent la progression des fourches de réplication et causent des cassures simple brin de l'hélice d'ADN qui vont activer des réponses cellulaires. Les radiations ionisantes ainsi que la plupart des agents chimiques mutagènes créent quant à eux des cassures double-brin de l'ADN (CDBs). Les CDBs générées par les agents chimiques impliquent différents mécanismes d'action dont l'inhibition d'enzymes importantes pour la réplication ou la réparation de l'ADN comme la topoisomérase II et l'ADN polymérase  $\alpha$  ou des réactions chimiques qui modifient directement les bases azotées de l'ADN.

## **La détection des dommages à l'ADN**

Le premier évènement qui survient lorsque l'ADN subit une lésion consiste à la Poly ADP-ribosylation des histones au niveau des sites de dommage. Les enzymes clefs responsables de l'ajout du Poly(ADP-Ribose) ou PAR, sont les Poly-(ADP-Ribose) polymérases 1, 2 et 3, tandis que la réaction inverse est catalysée par une enzyme appelée PARG ou Poly(ADP-Ribose)glycohydrolase [12]. Plus précisément, en réponse à des lésions de l'ADN, la protéine PARP1 ADP-ribosyle des lysines sur la queue N-terminale des histones structurales H2A, H2B, H3 et H4 aux sites de dommages [13, 14]. Ces

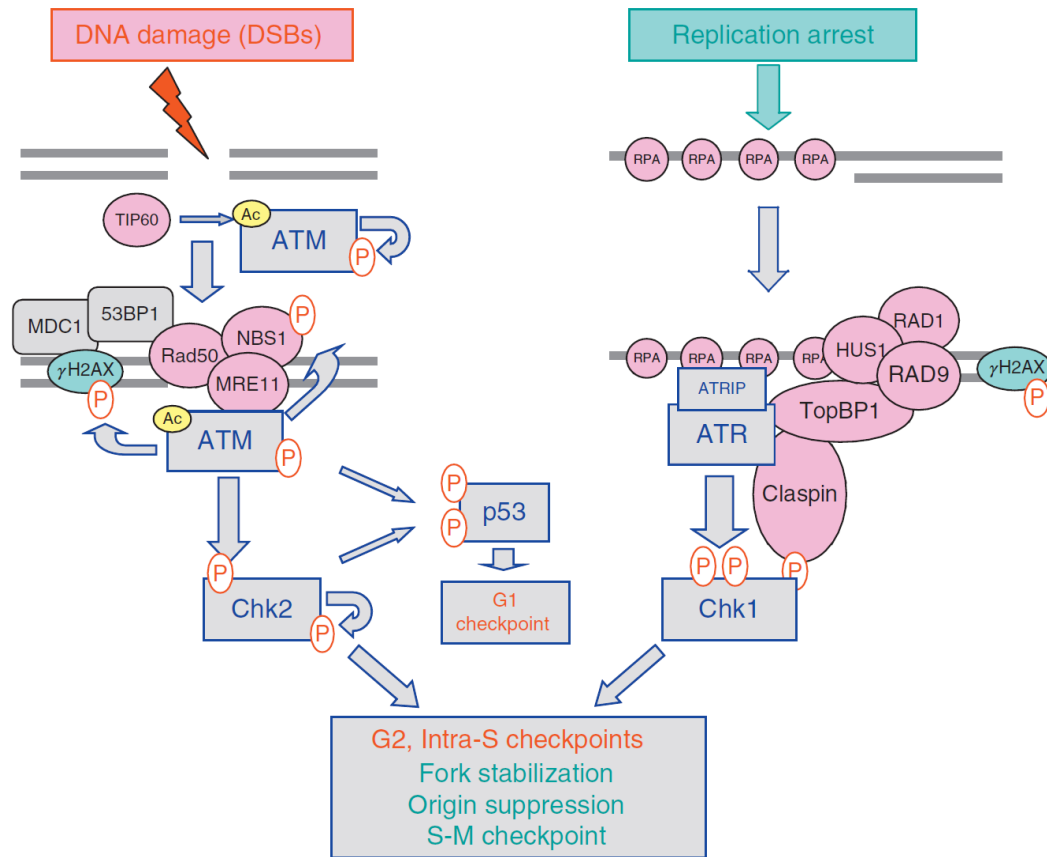
chaînes PAR ajoutées aux histones, permettent le recrutement des remodeleurs de la chromatine tels que la protéine déacétylase NuRD (Nucleosome remodeling and deacetylase) et les complexes polycomb [15-17]. Il en résulte qu'au site de dommage la transcription est réprimée [18], la chromatine est relaxée [12] et les sites de dommage sont rendus accessibles via le glissement des nucléosomes, ce qui permet le recrutement des complexes protéiques impliqués dans l'activation de la réponse cellulaire aux dommages [19, 20].

Les voies de signalisation activées suite à des lésions de l'ADN diffèrent en fonction de la nature des dommages. Ces derniers peuvent être regroupés en deux grandes catégories : Les cassures double-brin de l'ADN (CDBs) et les cassures simple brin (CSBs). Ces deux types de dommages sont relevés par des complexes protéiques multimériques différents qui activent les deux axes principaux de transducteurs de la réponse cellulaire, montrés à la Figure 2. Les CDBs de l'ADN sont reconnues par le complexe MRN (Mre11, Rad50, Nbs1) et activent préférentiellement la voie de signalisation ATM-CHK2 alors que les régions simple brin de l'ADN qui sont détectées par le complexe 9-1-1 (Hus1, Rad1, Rad9) activent la voie ATR-CHK1 [21].

### **Les voies de transduction de la réponse aux dommages à l'ADN**

La réponse aux dommages à l'ADN (RDA) est principalement médiée par deux axes de signalisation émergent des kinases ATM (Ataxia-Telangectasia Mutated) et ATR (Ataxia-Telangectasia and Rad3-Related), membres de la famille des phosphatidyl-inositol 3 Kinases (PI3 Kinases). À l'instar des PI3 kinases qui phosphorylent des lipides, ATM et ATR phosphorylent des substrats protéiques et sont, tel que présenté en Figure 1, des transducteurs de la RDA [22]. Dans les cellules, ATM et ATR sont principalement impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et la sénescence. Selon certaines études protéomiques, elles seraient la cible d'un nombre spectaculaire de protéines aux fonctions diverses (~900 protéines) et phosphoryleraient environ 700 substrats cellulaires [23-25]. En réponse à des lésions génotoxiques, les principaux substrats de ATM et ATR sont respectivement les sérine-thréonine kinases CHK2 et CHK1 qui sont transducteurs de la RDA et modulent l'activité

les effecteurs [7]. Les voies ATM-CHK2 et ATR-CHK1 décrites ci-dessous et schématisées à la Figure 2 sont les principaux axes de signalisation activés en réponse aux dommages à l'ADN chez les vertébrés [26].



Extrait de l'article Smith, J. Adv Cancer Res. 2010;108:73-112

**Figure 2 : Signalisation de la réponse aux dommages à l'ADN.**

Les deux principales voies de la réponse aux dommages à l'ADN, les voies ATM-CHK2 et ATR-CHK1, sont activées par les cassures double-brin de l'ADN et les arrêts de la réplication respectivement. ATM est recruté aux sites de CDBs est par le complexe MRN tandis qu'ATR est recruté aux sites d'ADN simple-brin par la protéine ATRIP, qui lie la protéine RPA sur les régions d'ADN simple-brin. ATM et ATR activent les thréonine kinases CHK2 et CHK1 respectivement. Ces deux cascades, ATM-Chk2 et ATR-Chk1, conduisent à la phosphorylation d'effecteurs qui activent les points de contrôle du cycle cellulaire.

## La voie ATM-CHK2

La protéine ATM, en absence de dommages, existe sous forme d'homodimères inactifs. Lorsqu'il y a une cassure double brin de l'ADN, une séquence d'évènements d'autophosphorylation conduit à l'activation d'ATM par la dissociation des homodimères inactifs en monomères partiellement activés [27]. Bien que le signal initiateur du processus d'autophosphorylation demeure à ce jour inconnu, il est proposé que cette étape initiale dans l'activation d'ATM puisse découler d'interactions à distance avec des altérations structurelles de la chromatine où la topologie se trouve modifiée suite aux dommages [27]. Le premier site d'autophosphorylation d'ATM à avoir été décrit chez l'humain est la sérine 1981 (S1981) [27]. Bien que l'ablation de ce site de phosphorylation chez la souris (S1987) n'ait pas de conséquences sur les fonctions connues d'ATM [28], la phosphorylation de S1981 corrèle très fortement avec l'activité de la kinase dans la grande majorité des contextes explorés jusqu'ici [27]. Dans certaines lignées cellulaires toutefois, ATM ne semble pas nécessiter l'autophosphorylation de la S1981 pour être activée : cet écart par rapport au modèle usuel peut s'expliquer par la nature différente des lésions génotoxiques induites dans ces expériences [29, 30]. Plus récemment, d'autres sites d'autophosphorylation sur la protéine ont été décrits, soit les sérines S367, S1893 et S2996 [31]. Pour monomériser et être activé, l'homodimère ATM doit également être acétylé sur la lysine 3016 par l'acétyl-transférase Tip60 [32, 33], un médiateur important de la RDA. Un autre médiateur de la RDA, appelé CK2 (casein kinase 2), phosphoryle le facteur HP1 $\beta$  qui est alors libéré de la chromatine. Cet évènement permet le recrutement du complexe ATM-Tip60 aux sites de lésions où l'interaction entre le chromodomaine de Tip60 et l'histone H3 méthylée (H3K9me3) stimule l'acétylation d'ATM et l'activation de son domaine kinase [34]. L'activation finale d'ATM aux sites de dommages est ensuite opérée grâce à son association avec la portion C-terminale de la sous-unité Nbs1 du complexe MRN (Mre11, Rad50, Nbs1) [35, 36]. En plus d'activer ATM, un des principaux rôles du complexe MRN est d'agir à titre d'ancre moléculaire servant à ponter les extrémités d'ADN de part et d'autre de la CDB [37, 38]. La protéine MDC1 est aussi un médiateur important de la cascade d'activation de la RDA puisqu'elle est requise au recrutement du complexe MRN [39, 40] et d'ATM [41] aux sites de dommages.

Les substrats d'ATM aux sites de dommages, tel qu'illustré à la Figure 2, comptent le variant H2AX de l'histone H2A [42], la sous-unité Nbs1 du complexe MRN, la protéine MDC1 (Mediator of DNA-damage checkpoint protein-1), la cohésine SMC1 [43], 53BP1 (p53-binding protein 1), BRCA1 (Breast cancer susceptibility gene 1) ainsi que la kinase CHK2 (Checkpoint kinase 2) [44]. Un des premiers événements à survenir à la suite de l'activation finale d'ATM aux sites de CDBs est la phosphorylation de H2AX, dont la forme phosphorylée  $\gamma$ -H2AX [42], constitue un marqueur bien caractérisé des sites de dommages à l'ADN. L'interaction entre ATM et  $\gamma$ -H2AX repose sur la présence du médiateur MDC1 [41]. Des données récentes ont montré que la déphosphorylation de H2AX sur le résidu Y142 est un prérequis à sa phosphorylation subséquente par ATM qui permet l'échafaudage des complexes protéiques de la réponse aux dommages à l'ADN [45]. MDC1 est phosphorylé par ATM, mais aussi, dans un second temps par CK2. Ces phosphorylations sont importantes puisqu'elles sont nécessaires à la rétention du complexe MRN aux sites de dommage [46, 47]. La phosphorylation de MDC1 par ATM permet aussi le recrutement des ubiquitine-ligases RNF8 et RNF168, qui ubiquitinylent les histones H2A et H2AX pour permettre le recrutement aux sites de dommages de multiples protéines dont 53BP1 et BRCA1 [48-51]. ATM phosphoryle également des substrats qui ne sont pas nécessairement concentrés aux sites de dommages : les interactions entre ATM et ces substrats, notamment p53, MDMX et MDM2 [52, 53] se tiendraient dans le nucléoplasme plutôt qu'aux sites de CDBs de l'ADN [44].

Bien qu'une multitude de substrats soient ciblés par ATM dans la cascade d'activation de la RDA, la kinase CHK2 demeure un substrat majeur d'ATM qui phosphoryle CHK2 sur la thréonine 68 [54]. Les données actuelles suggèrent qu'une fois activée, CHK2 se dissocie des sites de dommages pour diffuser dans le nucléoplasme où elle phosphoryle plusieurs substrats impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la transcription [55]. Ces substrats incluent le facteur de transcription suppresseur de tumeur p53 [56, 57] et sa protéine régulatrice MDMX [52], la famille des phosphatases Cdc25 [1, 58, 59], la protéine suppresseur de tumeur BRCA1 [60] et les facteurs de transcription FOXM1 [61] et E2F1 [62]. La modulation par CHK2 de ces effecteurs de la RDA sera discutée plus en détail dans les sections suivantes.

## La voie ATR-CHK1

La voie ATR-CHK1, schématisée à la Figure 2, est généralement activée par les arrêts de la réplication dus à des carences en nucléotides ou à des anomalies de l'ADN qui bloquent la progression des fourches de réplication. Tel que mentionné plus tôt, par exemple, les lésions 6-4PP et CPD causées par une exposition de l'ADN aux rayons UV, bloquent la réplication et activent la voie ATR-CHK1 [22]. Lorsque la fourche de réplication est bloquée, l'ADN polymérase se dissocie de l'hélicase répllicative [63] et génère des portions d'ADN simple brin ou des cassures simple brin (CSBs). Les CSBs sont rapidement reconnues par le complexe protéique trimérique RPA (Replicative protein A). L'appariement CSB-RPA permet le recrutement de la protéine ATRIP (ATR-Interacting Protein) qui à son tour mobilise et active ATR au site de dommage [64-66]. L'activation d'ATR, contrairement à ATM, ne semble ni dépendre d'une séquence d'autophosphorylation ni de modifications post-traductionnelles [22]. L'activation d'ATR conduit à la phosphorylation subséquente de la kinase CHK1 qui semble plutôt se produire via le recrutement de CHK1 aux sites de dommages et par son interaction avec les protéines médiatrices TOPBP1 et Claspin. TOPBP1 est recruté aux sites de CSBs par le complexe 9-1-1 composé des sous-unités RAD9, RAD1 et HUS1 [67]. Bien qu'il contienne un domaine stimulant l'activité d'ATR, le mécanisme par lequel TOPBP1 favorise l'activation initiale d'ATR demeure encore indéterminé [68, 69]. La protéine Claspin, qui s'associe aux fourches de réplication actives en absence de dommages [70] participe également à l'activation de CHK1 par ATR. Claspin, suite à sa phosphorylation ATR-dépendante sur un court motif répété compris dans le domaine d'interaction avec CHK1, recrute CHK1 et permet sa phosphorylation activatrice par ATR [71]. Plus récemment, une étude a démontré que deux nouveaux médiateurs, Timeless et Tipin (Timeless-Interacting Protein), sont aussi requis à l'activation de la voie ATR-CHK1 en réponse aux stress réplcatifs [72]. Timeless interagit avec ATR et avec CHK1 alors que Tipin lie la sous-unité RPA2 du complexe RPA et est requise pour l'association stable de Claspin et de Timeless avec les complexes RPA-CSB [73]. Comme CHK1 est recrutée aux sites de CSB par la protéine Claspin phosphorylée, elle peut être phosphorylée directement par ATR sur une multitude de motifs SQ/TQ situés en C-terminal dans sa boucle de régulation [74]. Parmi les résidus

phosphorylés, les sérines S317 et S345 sont largement utilisés comme marqueurs d'activation de la kinase CHK1. Bien qu'il soit clair que la phosphorylation de la S345 est nécessaire à l'activité biologique de CHK1, l'effet de cette modification sur la régulation de l'activité catalytique de CHK1 demeure peu exploré [75, 76]. Des données suggèrent que la phosphorylation de CHK1 par ATR stimule son activité kinase en levant l'auto-inhibition exercée par le domaine régulateur en C-terminal de CHK1 [76, 77] et en permettant sa dissociation de la chromatine [78].

Une fois activé, CHK1 se dissocie de Claspin pour phosphoryler des substrats nucléaires et cytoplasmiques [55]. Parmi ceux-ci notons les protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire telles que les phosphatases Cdc25A [79], Cdc25C [58] et la kinase Wee1 [80], dont la phosphorylation par CHK1 permet d'activer les points de contrôle du cycle cellulaire en phase G1, S et à la transition G2/M. De plus, CHK1 est suspectée d'être un régulateur de la recombinaison homologue et de la réparation de l'ADN via la phosphorylation de Rad51 [81] et BRCA2 [82]. Des données suggèrent que CHK1 participe aussi à la répression de la transcription induite par les dommages à l'ADN en phosphorylant l'histone H3 sur la thréonine 11 [83]. Bien que majoritairement nucléaire, CHK1 est aussi localisée dans le cytoplasme et des travaux plus récents ont révélé sa présence au niveau des centrosomes dans les cellules en interphase [78, 84-86]. Des données montrent aussi que CHK1 participe à la régulation de la transition G2/M aux centrosomes via la phosphorylation négative de Cdc25B, un régulateur positif du complexe Cdk1/CyclineB responsable de l'entrée en mitose [86, 87].

### **Activation concertée des voies ATM-CHK2 et ATR-CHK1**

Jusqu'ici, nous avons décrit les axes ATM-CHK2 et ATR-CHK1 comme étant deux voies de signalisation parallèles qui sont activées spécifiquement en réponse à des lésions de l'ADN distinctes et qui impliquent différentes protéines cellulaires. Cependant, dans les cellules on observe généralement une activation simultanée de ces deux axes. En effet, bien que la voie ATR-CHK1 soit majoritairement activée par l'ADN simple brin (CSBs) issu d'arrêts de la réplication, d'autres contextes peuvent générer des segments simple brin d'ADN activateurs de cette voie. Par exemple, le mécanisme de réparation par excision de

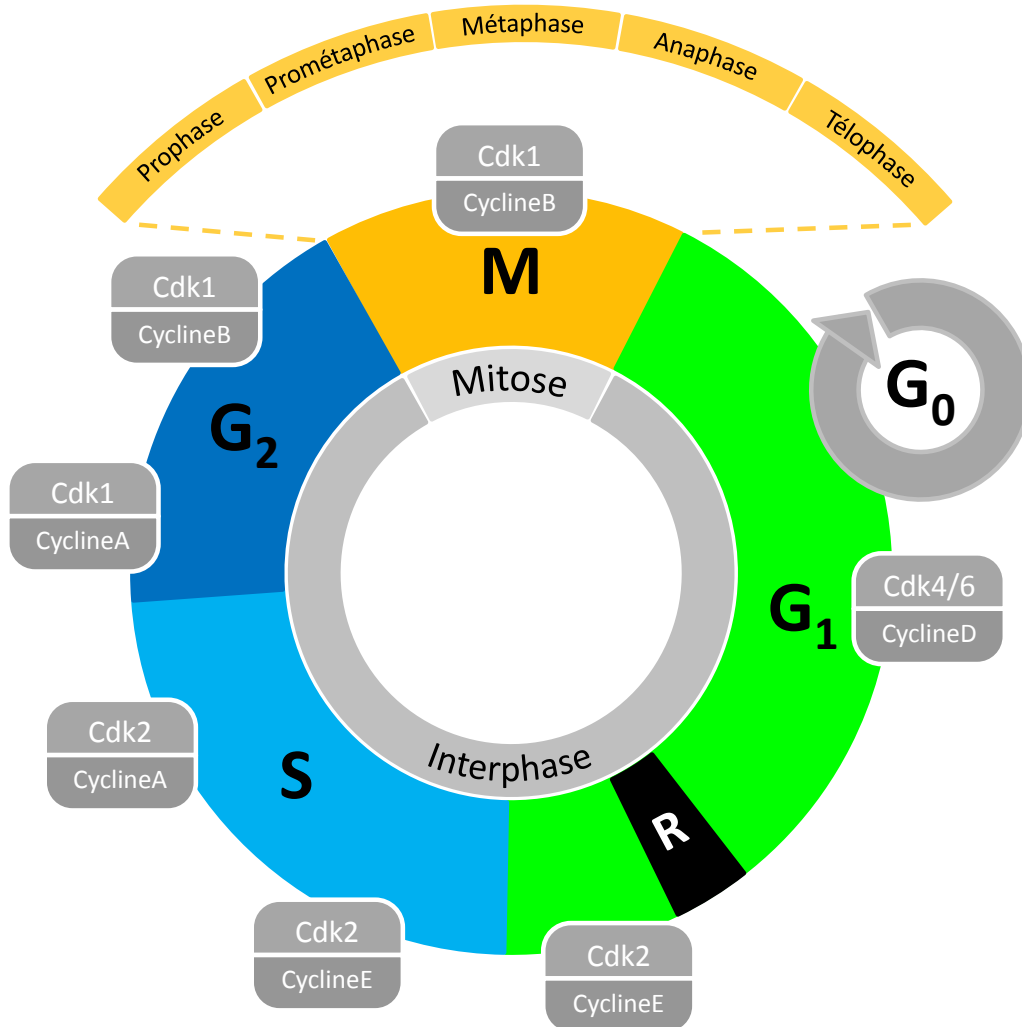


nucléotides (NER) aux sites de CDBs est générateur de CSBs qui sont reconnues par les complexes RPA et activent la voie ATR-CHK1 [88]. Il en résulte que les voies ATR-CHK1 et ATM-CHK2 peuvent être activées simultanément sur les sites de CDBs au niveau desquels le mécanisme de réparation NER est actif. La situation inverse se produit également : un segment simple brin de l'ADN qui active typiquement la voie ATR-CHK1 peut aussi conduire à l'activation de l'axe ATM-CHK2. En effet, lorsque la polymérase répliquative rencontre une cassure simple-brin ou un site abasique sur le brin répliqué cela peut conduire à un arrêt prolongé de la machinerie de réplication qui occasionne l'effondrement des fourches de réplication et génère des CDBs activatrices de la voie ATM-CHK2 [88]. Un dommage répliatif qui active préférentiellement la voie ATR-CHK1 peut donc également activer la voie ATM-CHK2. En réponse aux stress génotoxiques occasionnés par les radiations ionisantes et les agents chimiothérapeutiques utilisés dans le traitement des cancers, on observe donc généralement l'activation des 2 voies ATM-CHK2 et ATR-CHK1 de réponse aux dommages à l'ADN [88].

## **Le cycle cellulaire**

Le cycle cellulaire est défini par la séquence des événements compris entre deux divisions du corps cellulaire. Le cycle, présenté à la Figure 3, est divisé en deux grandes sections soit l'interphase et la mitose. L'interphase se compose d'une succession de phases distinctes appelées G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S et G<sub>2</sub>. La mitose (M) suit la phase G<sub>2</sub> et est caractérisée par la division du corps cellulaire. Chaque phase est caractérisée par des événements cytomorphologiques tels que l'accroissement de la taille cellulaire ou l'arrêt de croissance, la synthèse d'ADN, la vérification de l'intégrité génomique et la division cellulaire. La progression des cellules d'une phase à l'autre du cycle cellulaire est régulée par des événements moléculaires complexes incluant l'expression et l'activation séquentielle des complexes Cdk-Cyclines qui sont des régulateurs majeurs du cycle (Figure 3). En réponse à des dommages à l'ADN, la progression des cellules dans le cycle est arrêtée par l'activation de points contrôle « checkpoints ». L'activation des points de contrôle arrête la progression du cycle cellulaire aux transitions G<sub>1</sub>/S, G<sub>2</sub>/M ou en phase S. Ces arrêts vont favoriser la réparation de l'ADN et contribuent au maintien de la stabilité génomique des cellules en

prolifération. Comme des problèmes dans la régulation du cycle cellulaire est une caractéristique majeure des cellules tumorales, l'étude du cycle cellulaire et de ses points de contrôle est devenue un domaine d'important en recherche sur le cancer.



**Figure 3 : Le cycle cellulaire.**

Le cycle cellulaire se divise en deux parties. La première, appelée interphase, représente la portion du cycle cellulaire entre deux divisions où la cellule double son contenu en ADN et en protéines. L'interphase est constituée des phases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, de la phase de synthèse d'ADN (phase S) et de la phase G<sub>2</sub>. La seconde partie, phase de division du corps cellulaire proprement dite, s'appelle la mitose. La progression du cycle dans chaque phase est régulée par l'activité de complexes Cdk-Cycline spécifiques à chaque phase.

## Les phases du cycle cellulaire

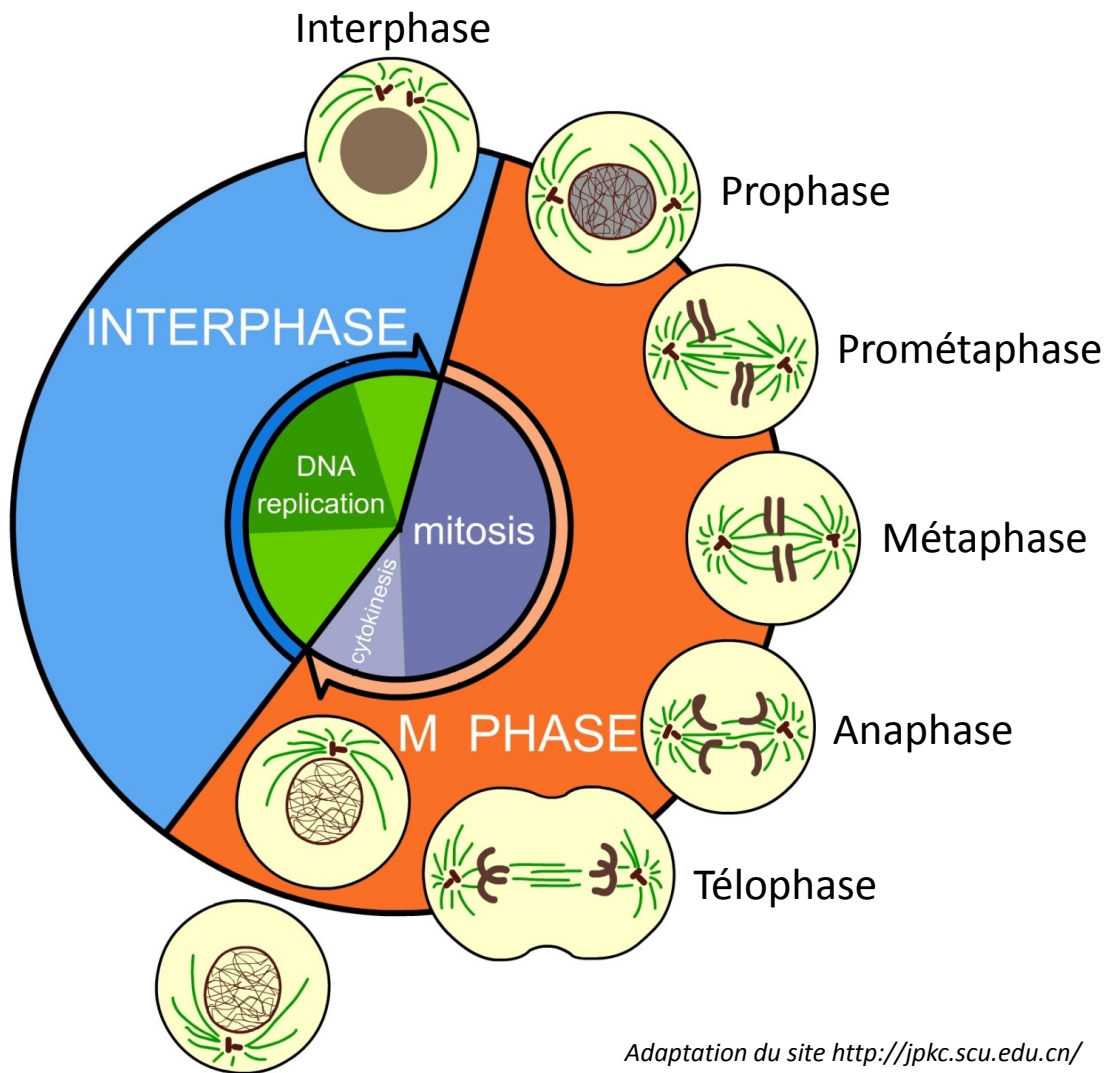
La première phase du cycle, la phase  $G_0/G_1$ , s'étend depuis la naissance d'une cellule fille jusqu'au début de la synthèse subséquente d'ADN d'où son nom de « Gap phase ». C'est la phase du cycle cellulaire dont la durée est la plus variable avec des longueurs variant de quelques heures à plusieurs mois selon le type cellulaire. Par exemple, une cellule épithéliale de muqueuse met entre 12 et 15 heures pour compléter la phase  $G_0/G_1$  tandis qu'un hépatocyte reste en  $G_0/G_1$  pendant environ 6 mois. La raison de ces différences est simple : c'est dans la phase  $G_0/G_1$  qu'une cellule est la plus influencée par la composition et la nature de son milieu extracellulaire (facteurs de croissance, cytokines, chemokines, hormones, matrices extracellulaires, ions, inhibition de contact, etc.). Selon les signaux qu'elle reçoit en  $G_0/G_1$ , la cellule va prendre la décision de poursuivre son cycle en phase S ou d'arrêter de proliférer et demeurer dans un état de quiescence [89]. Selon le contexte extracellulaire, les cellules quiescentes décident si elles vont se différencier, demeurer en arrêt prolifératif transitoire ou entrer en sénescence. Puisque les cellules quiescentes différenciées ou sénescents ne se divisent plus, elles sont dites dans la phase  $G_0$  qui est considérée hors du cycle cellulaire (elles ne « cyclent » plus). Chez les cellules qui prolifèrent, il existe un point de restriction (R) à la fin de phase  $G_1$ . À partir de ce point de restriction, la cellule se commet à poursuivre ou non sa progression dans le reste du cycle soit les phases S- $G_2$ -M. Bien qu'une cellule ayant franchi le point R puisse être freinée dans sa progression par des événements adverses, elle poursuivra inéluctablement dans le cycle jusqu'à la phase  $G_1$  suivante.

La phase S est la phase de synthèse de l'ADN. C'est le moment du cycle où la cellule va dupliquer ses chromosomes. Dans des conditions normales, la phase S dure environ 4 heures. La phase S se subdivise en deux sous-phases : la phase précoce et la phase tardive qui sont séparées par la pause  $3n$ . La phase précoce, qui s'étend sur les deux tiers de la phase S, est caractérisée par la réplication lente et fidèle de l'euchromatine qui contient les gènes transcriptionnellement actifs. La lenteur de ce processus est due à la machinerie moléculaire impliquée dont la grande fidélité permet une duplication exacte des gènes importants avec un taux d'erreur minimal. La phase tardive, qui occupe le dernier tiers de la phase S, est caractérisée par une réplication rapide, mais peu fidèle de

l'hétérochromatine qui code pour les gènes transcriptionnellement inactifs et les régions non-codantes. La pause  $3n$ , située à l'interface entre les phases précoce et tardive, représente le point de transition où la synthèse de l'ADN s'arrête pour :1) permettre à la machinerie réplivative fidèle, mais lente d'être remplacée par une machinerie réplivative rapide et peu fidèle, 2) pallier à des désordres d'équilibre dans la disponibilité des nucléotides et 3) réparer le brin direct en cours de réplification en cas de dommages. À l'interface entre la phase précoce et tardive de la phase S, la cellule a répliqué son euchromatine mais pas son hétérochromatine. Son contenu en ADN est alors équivalent à  $3n$  d'où le nom de « pause  $3n$  ».

La phase  $G_2$ , appelée aussi la phase prémitotique, suit la phase S dûment complétée et précède la mitose. Elle est caractérisée par une augmentation du rythme de la synthèse protéique contribuant à une augmentation de la taille cellulaire. En phase  $G_2$ , la cellule vérifie également l'intégrité de son génome répliqué et fait les correctifs nécessaires au besoin, évitant ainsi la transmission de mutations ou aberrations de l'ADN aux cellules filles issues de la division. Il est intéressant de noter que certaines cellules, notamment des cellules de Xénope ainsi que certaines cellules cancéreuses n'ont pas de phase  $G_2$  et passent directement de la phase de synthèse d'ADN à la mitose [90, 91].

Lorsque la cellule termine la phase  $G_2$ , elle aborde la mitose qui est la phase de division du corps cellulaire. Tel que présenté à la Figure 4, la mitose est subdivisée en 5 stades comportant des caractéristiques distinctes : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Compte tenu de son importance pour mon projet de recherche, la mitose et les évènements moléculaires qui la régissent seront décrits plus en détail dans une section suivante.



**Figure 4 : La mitose.**

La mitose, phase de division du corps cellulaire, se compose de cinq phases. Dans l'ordre ces phases sont la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la téléphase. C'est en mitose qu'est divisé le matériel génétique dupliqué pendant l'interphase et que seront formées deux nouvelles cellules à partir d'une seule cellule mère. La mitose se termine par la scission du corps cellulaire, générant deux cellules filles qui sont de retour à la phase G1 de l'interphase.

## Régulation du cycle cellulaire

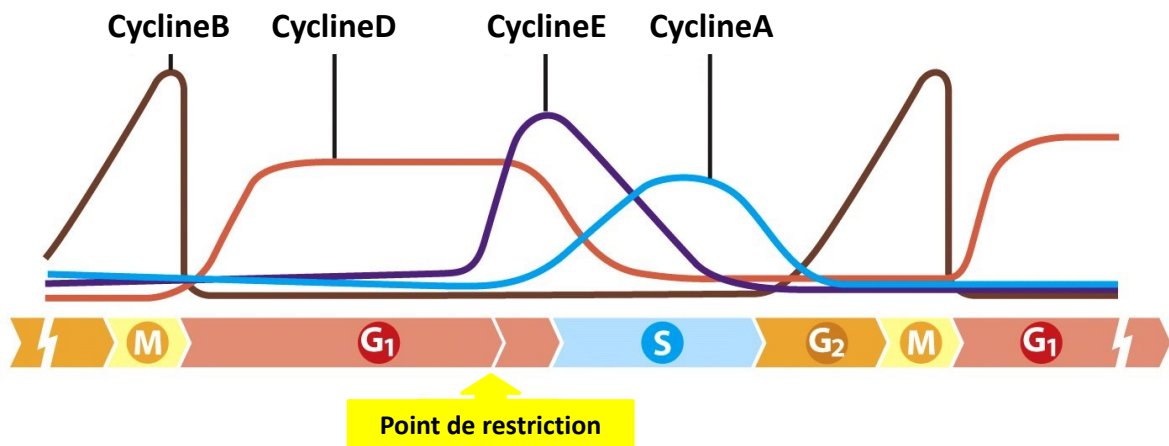
### Les complexes Cdk-Cycline

La progression du cycle cellulaire est séquentielle et finement orchestrée. Au début des années '70, les premiers balbutiements quant à l'identification des acteurs moléculaires responsables de la régulation du cycle cellulaire ont mené à l'identification du facteur MPF (Maturation Promoting Factor) [92, 93]. Dans la décennie qui a suivi, les chercheurs Sir Paul Nurse et Leland H. Hartwell, ont identifié les gènes qui régulent la division cellulaire [94, 95]. En 1983, la découverte des cyclines par le Pr. Tim Hunt et ses collègues a permis la mise en place du modèle actuel de régulation du cycle cellulaire [96]. Ce sont ces découvertes majeures qui ont valu aux trois chercheurs le prix Nobel de Physiologie ou Médecine 2001.

Les complexes Cdk-Cycline sont des hétérodimères composés d'une kinase Cdk et d'une Cycline exempte d'activité catalytique. La kinase Cdk seule n'est pas active et doit s'associer à une Cycline pour pouvoir phosphoryler ses substrats. La Cycline est conséquemment la sous-unité régulatrice de l'activité kinase du complexe Cdk-Cycline. Il existe plusieurs kinases Cdks et Cyclines codées par des gènes différents qui possèdent plusieurs variants d'épissage. Les Cyclines et Cdks s'apparient selon des combinaisons spécifiques qui interviennent à des moments précis du cycle cellulaire [97-99] (Figure 3 p.XX). Les Cdks qui régulent la progression du cycle sont Cdk1, Cdk2, Cdk4 et Cdk6. Les cyclines régulatrices sont les Cyclines D, E, A et B.

La phase  $G_1$  est conduite par les complexes Cdk4/6-CyclineD [100] alors que la transition  $G_1/S$  et la progression de la phase S sont régies, respectivement par le complexe Cdk2-CyclineE et Cdk2-CyclineA [101-107]. Au début de la phase  $G_2$ , le complexe Cdk1-CyclineA prend le relai pour faire place au complexe Cdk1-CyclineB qui sera actif à partir de la fin de la phase  $G_2$  jusqu'à l'anaphase de la mitose. Tel que mentionné plus tôt, c'est l'apparition séquentielle des cyclines qui dicte l'activité des complexes Cdk-Cycline propres à chaque étape du cycle cellulaire. Comme les Cdks sont généralement très stables et que leurs niveaux d'expression ne varient que très subtilement au cours du cycle, la régulation de l'activité des complexes Cdk-Cycline est le résultat de l'équilibre entre

l'expression et la dégradation séquentielle des cyclines au cours du cycle cellulaire, tel que montré en Figure 5. La destruction des cyclines est un phénomène très rapide qui est principalement régulé par deux complexes E3 ubiquitine-ligase : le complexe SCF et le cyclosome APC/C. En s'associant à des protéines adaptatrices qui leur confèrent leur spécificité de substrat, ces complexes poly-ubiquitinylent les Cyclines, les conduisant à leur dégradation protéasomale. Le complexe SCF poly-ubiquitinyne les Cyclines D, A et E en interphase tandis que le complexe APC/C poly-ubiquitinyne les Cyclines A et B exprimées en mitose et au début de la phase G<sub>1</sub>.



Adaptation du livre Biology of Cancer, Figure 8-10 (© Garland Science 2007)

### Figure 5 : Régulation du cycle cellulaire par les complexes Cdk-Cycline.

La progression du cycle cellulaire est régulée par l'activité des complexes Cdk-Cycline dont l'activité kinase dépend essentiellement de la présence des Cyclines. L'équilibre entre l'expression et la dégradation des Cyclines régule l'activité des complexes Cdk-Cycline et ainsi la progression des cellules dans les différentes phases du cycle.

## Les inhibiteurs des complexes Cdk-Cycline

Les complexes Cdk-Cycline peuvent être régulés négativement par les inhibiteurs CKIs (Cdk Inhibitors) qui freinent la progression du cycle cellulaire surtout en phase G1 et S. Les CKI sont classés en deux sous-familles, la famille des INK4 et la famille des Cip/Kip, qui regroupent les inhibiteurs selon leurs structures et spécificités de substrats. Les protéines de la famille des INK4, nommées p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> et p19<sup>INK4d</sup> inhibent spécifiquement les kinases Cdk4 et Cdk6 sans altérer l'activité des Cdk dépendantes des Cyclines E, A et B [108-112]. L'inhibition de Cdk4 et Cdk6 empêche la phosphorylation CDK4/6-dépendante de pRb qui maintient alors la séquestration du facteur de transcription E2F et retarde l'expression de la CyclineA importante à la phase S. Cela a pour conséquence d'arrêter la progression du cycle en phase G1. À titre d'exemple, la présence de TGF-β dans le milieu extracellulaire est un signal anti-mitogénique fort qui aboutit à la transactivation du gène de p15INK4b qui, lorsqu'exprimé, freine la progression de la phase G1 en inhibant les complexes Cdk4/6- CyclineD. Les inhibiteurs de la sous-famille des Cip/Kip, soit p21, p27 et p57, inhibent quant à eux l'activité kinase de Cdk2 [113-123]. Les CKI ne possèdent pas d'activité kinase intrinsèque, mais comprennent des motifs qui leur permettent de séquestrer et inhiber tant les Cdk que les Cyclines [124-128]. Des données récentes suggèrent que p21 et p27 peuvent aussi agir, en phase G<sub>1</sub>, comme cofacteurs nécessaires à l'activité kinase des complexes CyclineD-dépendants. Dans ce contexte p21 et p27 agiraient plutôt comme des activateurs du cycle cellulaire [129]. L'expression des CKI est régulée tout au long du cycle cellulaire. L'expression E2F-dépendante de la CyclineE induit l'augmentation de la concentration effective des complexes Cdk2-CyclineE qui vont phosphoryler p21 et p27 pour les diriger vers la voie de dégradation protéasomale. Ce mécanisme constitue une boucle de renforcement positif du signal qui pousse la cellule vers la phase S [108, 119, 121].



# La Mitose

## Description

La mitose, telle que présentée à la Figure 4, se compose de plusieurs phases successives (prophase, prometaphase, métaphase, anaphase et télophase) qui aboutissent à la scission du corps cellulaire et du matériel chromosomique d'une cellule pour donner naissance à deux cellules filles identiques.

En interphase, le matériel génétique est sous sa forme relaxée dans le noyau et c'est durant la prophase mitotique que les premiers changements morphologiques importants se produisent. En prophase on observe la condensation de l'ADN, la disparition des nucléoles, le démantèlement de l'enveloppe nucléaire, l'élongation des microtubules astraux du fuseau mitotique et le début de la migration des centrosomes dupliqués vers les pôles mitotiques. En prometaphase, les pôles du fuseau mitotique se définissent plus clairement. Les centrosomes sont diamétralement opposés aux pôles de la cellule et servent de point d'origine du fuseau mitotique en développement. Une fois formé, le fuseau mitotique agrippe littéralement les chromosomes au niveau de leurs kinétochores pour les tracter vers la plaque équatoriale. Les kinétochores sont des échafaudages protéiques organisés sur les centromères des chromosomes condensés et leur fonction est d'attacher les chromosomes aux microtubules. Ainsi, via des forces égales, mais opposées, le fuseau mitotique regroupe les chromosomes sur la plaque équatoriale, plan centre situé exactement entre les deux pôles de la cellule. Lorsque la cellule a aligné avec succès tous ses chromosomes sur la plaque équatoriale, elle est en métaphase. À ce moment précis, toutes les chromatides sœurs sont face à face sur la plaque équatoriale et accrochées de part et d'autre du fuseau mitotique. On dit alors qu'elles sont « bi-orientées ». La bi-orientation des chromatides sœurs sur la plaque équatoriale va déclencher l'anaphase au cours de laquelle les chromatides sœurs des chromosomes dupliqués se séparent vers les pôles opposés de la cellule grâce au raccourcissement progressif du fuseau mitotique. Au cours de la phase suivante, appelée la télophase, une enveloppe nucléaire se reforme autour du matériel génétique, les chromosomes se décondensent et un sillon de clivage s'établit à l'endroit où s'était formée la plaque équatoriale. Ce sillon de clivage et les protéines associées appelé le

«mid-body», va progressivement s'étrangler et finir par se refermer totalement créant ainsi deux cellules filles. Ce moment correspond à la cytokinèse, qui désigne la coupure du pont cytoplasmique reliant les deux corps cellulaires et qui est considérée par certains auteurs comme partie intégrante de la télophase. Les deux cellules filles générées par la mitose vont ensuite retourner en phase G<sub>1</sub>.

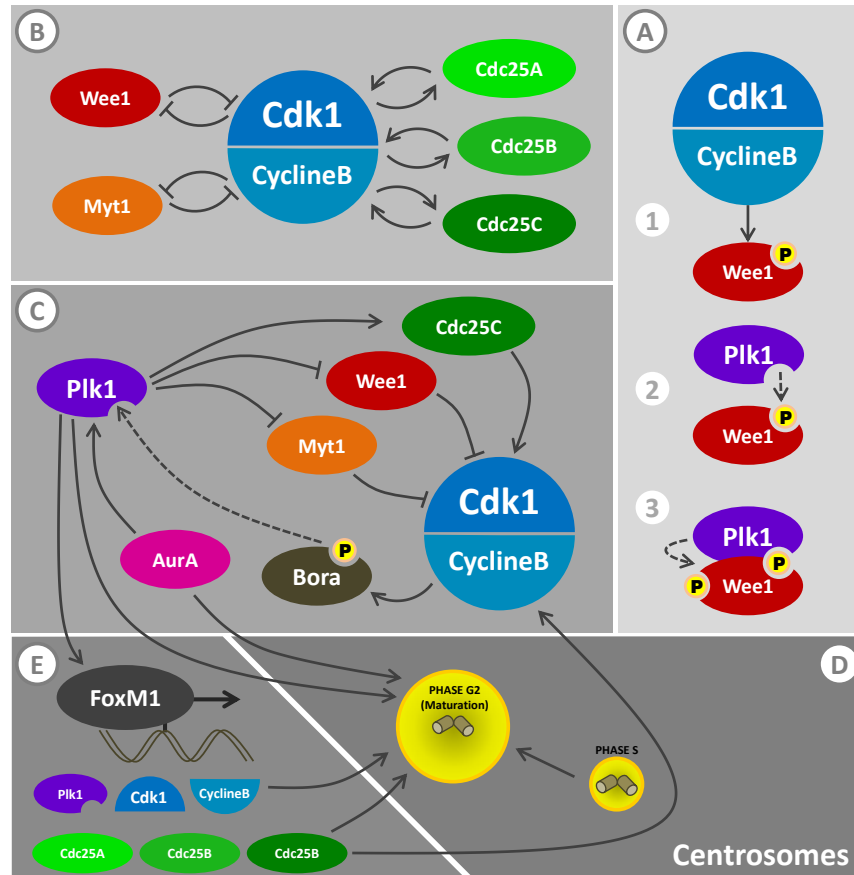
### **Régulation de l'entrée en mitose**

L'entrée des cellules en mitose dépend de l'activité kinase du complexe Cdk1-CyclineB. Plusieurs mécanismes veillent à ce que le complexe Cdk1-CyclineB soit activé au bon moment et au bon endroit dans la cellule et il est important de mentionner que la régulation du complexe implique plusieurs voies de signalisation qui s'entrecroisent, tel qu'illustré à la Figure 6. Ces voies, mettent en scène à la fois un équilibre entre l'expression et la dégradation de la CyclineB ainsi que des activités opposées de kinases et de phosphatases qui constituent des boucles de rétro-activation du complexe Cdk1-CyclineB.

### **Expression et accumulation de la CyclineB**

En phase S, les complexes Cdk2-CyclineA actifs phosphorylent et activent plusieurs substrats, dont les facteurs de transcription FoxM1, NF-Y et B-Myb. Ces derniers transactivent le gène de la CyclineB et la protéine s'accumule progressivement depuis la phase S jusqu'à la mi-G<sub>2</sub>. Régulée de cette façon, l'expression de la CyclineB ne peut prendre place que lorsque le complexe Cdk2-CyclineA est activé en phase S, assurant ainsi son expression au bon moment du cycle [130-135]. La CyclineB, dont les niveaux augmentent en S-G<sub>2</sub>, transite entre le cytoplasme et le noyau. Sa localisation dans la cellule est définie par la direction de l'équilibre import/export nucléaire. En phase S et au début de la phase G<sub>2</sub>, la CyclineB est majoritairement exportée du noyau vers le compartiment cytoplasmique [136, 137] et à partir de la mi-G<sub>2</sub>, une sous population de la CyclineB s'accumule sur les centrosomes en maturation (Figure 6D) [138]. Plusieurs travaux suggèrent que lorsque l'accumulation de la CyclineB aux centrosomes atteint son maximum les premiers signes d'activité des complexes Cdk1-CyclineB sont détectés sur les centrosomes [138]. Une fois activé aux centrosomes, le complexe Cdk1-CyclineB migre

dans le noyau où son activité est amplifiée par plusieurs boucles de rétroaction positives conduisant à l'entrée irréversible des cellules en mitose [136, 139, 140].



Adaptation de l'article *J Cell Biol.* 2009 April 20; 185(2): 193–202.

### Figure 6 : Régulation de l'entrée en mitose.

L'entrée en mitose est principalement gouvernée par l'activité du complexe Cdk1-CyclineB. À la fin G2, plusieurs mécanismes poussent la cellule en mitose en promouvant l'activité des complexes Cdk1-CyclineB. A) Le complexe Cdk1-CyclineB actif phosphoryle Wee1, une kinase qui l'inhibe directement, et ainsi permet la phosphorylation négative de Wee1 par Plk1. B) Les boucles de rétroaction internes du complexe Cdk1-CyclineB sont définies par le complexe Cdk1-CyclineB activé qui module positivement ses activateurs directs (les phosphatases Cdc25A-C) et qui régule négativement ses inhibiteurs directs (Wee1 et Myt1). C) Les boucles de rétroaction externes favorisent l'activation du complexe Cdk1-CyclineB indirectement via l'activation de la protéine Bora, qui en partenariat avec la kinase Plk1 favorise en retour l'activation du complexe Cdk1-CyclineB en activant ses activateurs (Cdc25C) et inhibant ses inhibiteurs (Wee, Myt1). D) Le complexe Cdk1-CyclineB promeut la maturation des centrosomes et y favorise son accumulation. L'atteinte d'une concentration critique de complexes Cdk1-CyclineB est nécessaire au renforcement positif de sa propre activation, constituant ainsi une boucle de rétroaction externe. E) Le complexe Cdk1-CyclineB, par le biais de Plk1, active le facteur de transcription FOXM1 qui transactive les gènes de promoteurs de sa propre activité (Cdc25A-C, Cdk1 et CyclineB) constituant également une boucle de rétroaction externe.

## **Les boucles de rétroaction internes du complexe Cdk1-CyclineB**

Les boucles de rétroaction interne, schématisées à la Figure 6B, tiennent leur nom de l'interaction *directe* entre la kinase Cdk1 et ses inhibiteurs et activateurs. L'état de phosphorylation de Cdk1 sur les résidus T14/Y15 qui dicte son activité, est contrôlé par un équilibre entre l'activité des protéines kinases inhibitrices Myt1 et Wee1, et celle des phosphatases à double spécificité Cdc25A, B et C. Wee1 est une kinase essentiellement nucléaire qui localise également aux centrosomes [141]. Myt1 est une kinase ancrée à la surface des organelles membranaires retrouvées dans le cytoplasme [142, 143]. Cdk1, pour être activée, doit être phosphorylée par la kinase nucléaire CAK (Cdk-activating kinase) sur la T161 localisée dans sa boucle de régulation T. Cette phosphorylation par CAK est constitutive et prend place dans toutes les conditions testées jusqu'à présent [144]. Une fois activé, le complexe Cdk1-CyclineB phosphoryle et inactive Wee1 et Myt1, soutenant ainsi sa propre activation. Wee1, lorsque phosphorylée par Cdk1, est ubiquitinylée par l'ubiquitine-ligase E3 SCF<sup>β-TRCP</sup> puis dégradée par le protéasome 26S. La phosphorylation de Myt1 par Cdk1 induit quant à elle une voie inhibant son activité kinase [145, 146]. L'activité kinase du complexe Cdk1-CyclineB est également dépendante des sérine/thréonine phosphatases Cdc25A, B et C. Ces phosphatases enlèvent les phosphorylations inhibitrices sur les acides aminés T14/Y15 de Cdk1 et ainsi activent la kinase [147]. En fin de phase G<sub>2</sub>, Cdc25B et C sont recrutées aux centrosomes où Cdc25B initie l'activation du complexe Cdk1-cycline B. Dans la littérature, Cdc25B est donc fortement suspectée d'être l'instigatrice de la chaîne d'évènements conduisant à l'activation du complexe Cdk1-CyclineB [148-155]. Une fois activé, le complexe kinase Cdk1-CyclineB active à son tour la phosphatase Cdc25C, stabilise Cdc25A et permet la relocalisation de Cdc25B dans le cytoplasme. Les Cdc25 étant des régulateurs positifs de Cdk1-cyclineB, cela va contribuer à augmenter encore davantage l'activation du complexe mitotique dans une boucle de régulation positive [149, 156-158]. Ainsi, lorsque le complexe Cdk1-CyclineB est activé, il inhibe ses inhibiteurs et active ses activateurs directs (Figure 6B) d'où le qualificatif de « boucles de rétroaction (positives) internes ».

## **Les boucles de rétroaction externes du complexe Cdk1-CyclineB**

À la différence des boucles internes qui régulent directement l'activité de Cdk1-CyclineB, les boucles de rétroaction externes régulent l'activité du complexe indirectement via une panoplie d'intermédiaires de signalisation (Figure 6B-E).

La protéine kinase Polo-like kinase 1 (Plk1) est un joueur majeur des boucles de rétroaction externes. Une fois activée, Plk1 va augmenter indirectement l'activité de Cdk1-CyclinB en favorisant l'activation des phosphatases CDC25B et C et l'inhibition et la dégradation de Myt1 et Wee1, des régulateurs majeurs de Cdk1-CyclineB [146, 159, 160]. Dans les cellules en début de mitose, Plk1 est mobilisée au niveau des centrosomes via son interaction avec la hCenexine et aux kinétochores où elle est recrutée par des protéines telles que PBIP1 et Bub1 [161-165]. L'activation de Plk1 nécessite la phosphorylation du résidu conservé T210 situé dans sa boucle d'activation T. Chez l'humain, ce résidu est phosphorylé par la kinase AuroraA en fin de phase G<sub>2</sub>/début de mitose (Figure 6C) [166, 167]. Comme AuroraA localise également aux centrosomes en fin de G<sub>2</sub>/début mitose, et que le phosphosite T210 de Plk1 est d'abord détecté aux centrosomes en début de mitose, l'activation initiale de Plk1 est fortement suspectée d'avoir lieu aux centrosomes [166]. La kinase AuroraA est activée par un mécanisme d'autophosphorylation sur la T288 située dans sa boucle d'activation [168, 169]. Cette phosphorylation de la T288 n'est toutefois pas suffisante puisque la phosphorylation par AuroraA de la T210 de Plk1 nécessite aussi le cofacteur Bora (Figure 6C) [166, 167]. En phosphorylant Bora, Cdk1-CyclineB facilite l'interaction Bora-AuroraA, augmentant ainsi la capacité d'AuroraA à phosphoryler et activer Plk1 [170, 171]. AuroraA est également régulée négativement par la protéine phosphatase PP1 qui déphosphoryle son site T288. Le complexe Cdk1-CyclineB inhibe la déphosphorylation de AuroraA par PP1 en phosphorylant et inhibant directement PP1, favorisant ainsi sa propre activation par la boucle de régulation positive AuroraA/Bora-Plk1 [172-174].

Tel que mentionné plus haut, la phosphorylation de Wee1 par Cdk1-CyclineB initie une cascade conduisant à la dégradation de Wee1 par le protéasome (Figure 6A). En phosphorylant Wee1 (6A-1), Cdk1 génère un site d'arrimage reconnu par la kinase Plk1 (6A-2). Plk1 phosphoryle Wee1 à son tour (6A-3), créant un phosphodégron (F-Box)

reconnu par la protéine  $\beta$ -TRCP, une sous-unité du complexe ubiquitine ligase E3 SCF <sup>$\beta$ -TRCP</sup> [160]. Wee1 est alors polyubiquitinylé et dégradé par le protéasome 26S [159]. Dans ce contexte, Plk1 promeut donc indirectement l'activation du complexe Cdk1-CyclineB en modulant positivement la boucle d'activation interne.

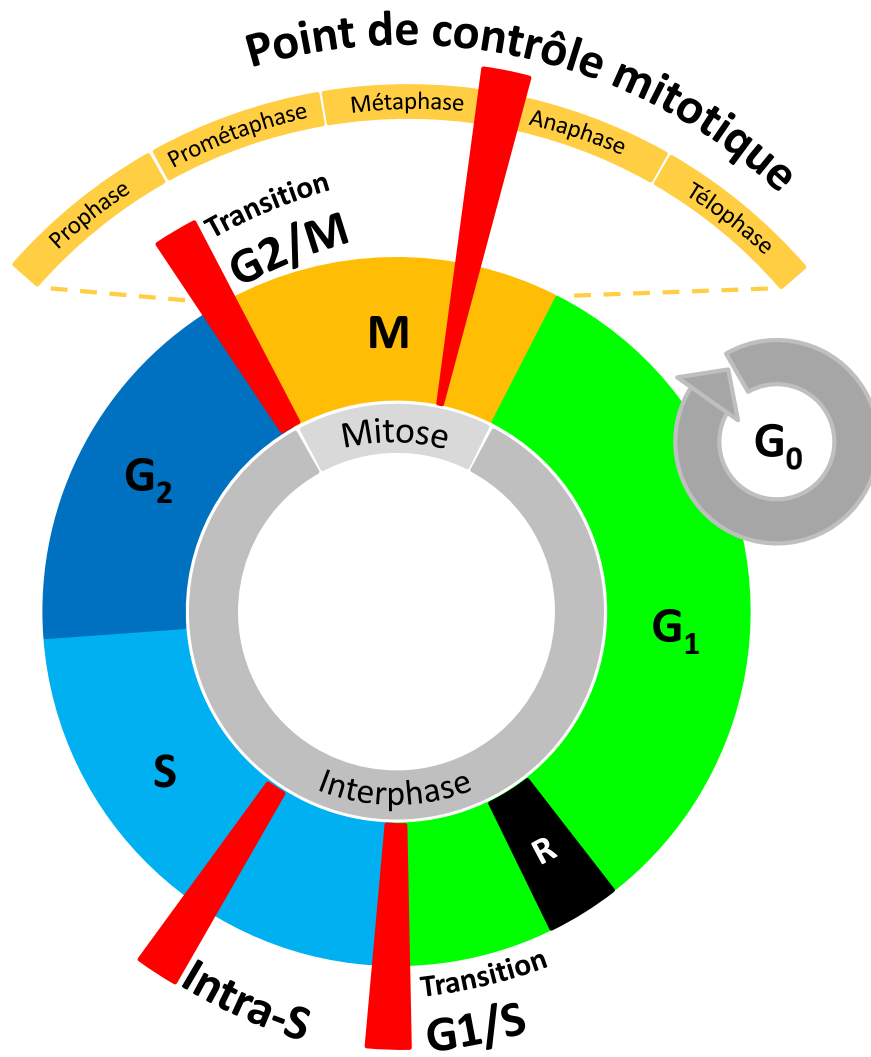
Des publications plus récentes ont mis en évidence l'activation Plk1-dépendante du facteur de transcription FoxM1 [175]. FoxM1, tel que schématisé à la Figure 6E, transactive plusieurs gènes régulateurs de l'entrée en mitose dont les gènes codant pour la CyclineB, Plk1, les phosphatases Cdc25 A, B et C ainsi que des sous-unités du complexe SCF [176-178]. Ainsi, l'activation Cdk1-dépendante de Plk1 conduit également à une augmentation de la concentration intracellulaire de plusieurs effecteurs positifs de l'entrée en mitose, constituant une boucle de rétroaction positive de l'activation du complexe Cdk1-CyclineB.

La dissection des voies de signalisation qui contrôlent l'entrée en mitose à la transition G<sub>2</sub>/M révèle très clairement leur nature entrelacée et leur organisation en boucles de rétroaction qui s'influencent mutuellement. Si la cellule rencontre des problèmes en phase G<sub>2</sub> tels que des dommages à l'ADN, une réplication de l'ADN incomplète ou d'autres stress, la cellule va activer des mécanismes permettant d'inhiber l'activation de Cdk1-CyclineB et l'entrée en mitose. Ces mécanismes seront discutés en de plus amples détails dans la section des points de contrôle du cycle cellulaire.

## **Points de contrôle du cycle cellulaire**

En présence de lésions génotoxiques, de problèmes de réplication ou de défaillance dans la structure et l'organisation de la chromatine, les cellules ont au cours de l'évolution, mis sur pied des mécanismes qui leur permettent d'arrêter la progression du cycle de division pour réparer les dommages ou le cas échéant, mourir. Ces mécanismes, appelés point de contrôles du cycle cellulaire ou « checkpoints », arrêtent la progression du cycle cellulaire en interphase à la transition G<sub>1</sub>/S, au cours de la phase S (intra-S) et à la transition G<sub>2</sub>/M. Un autre point de contrôle à la transition métaphase/anaphase de la mitose est activé en réponse à des problèmes d'attachement des chromosomes aux microtubules du fuseau mitotique (Figure 7). Généralement, les cellules cancéreuses présentent des défaillances

dans les mécanismes de régulation des points de contrôle du cycle cellulaire et continuent de proliférer même en présence de lésions génotoxiques. Ce comportement a pour effet d'augmenter l'instabilité génétique des cellules au sein des tumeurs et de favoriser la transformation et la progression tumorale. Il va donc sans dire que l'étude des points de contrôle du cycle cellulaire est un champ d'études hautement dynamique en recherche contre le cancer.



**Figure 7 : Les points de contrôle du cycle cellulaire.**

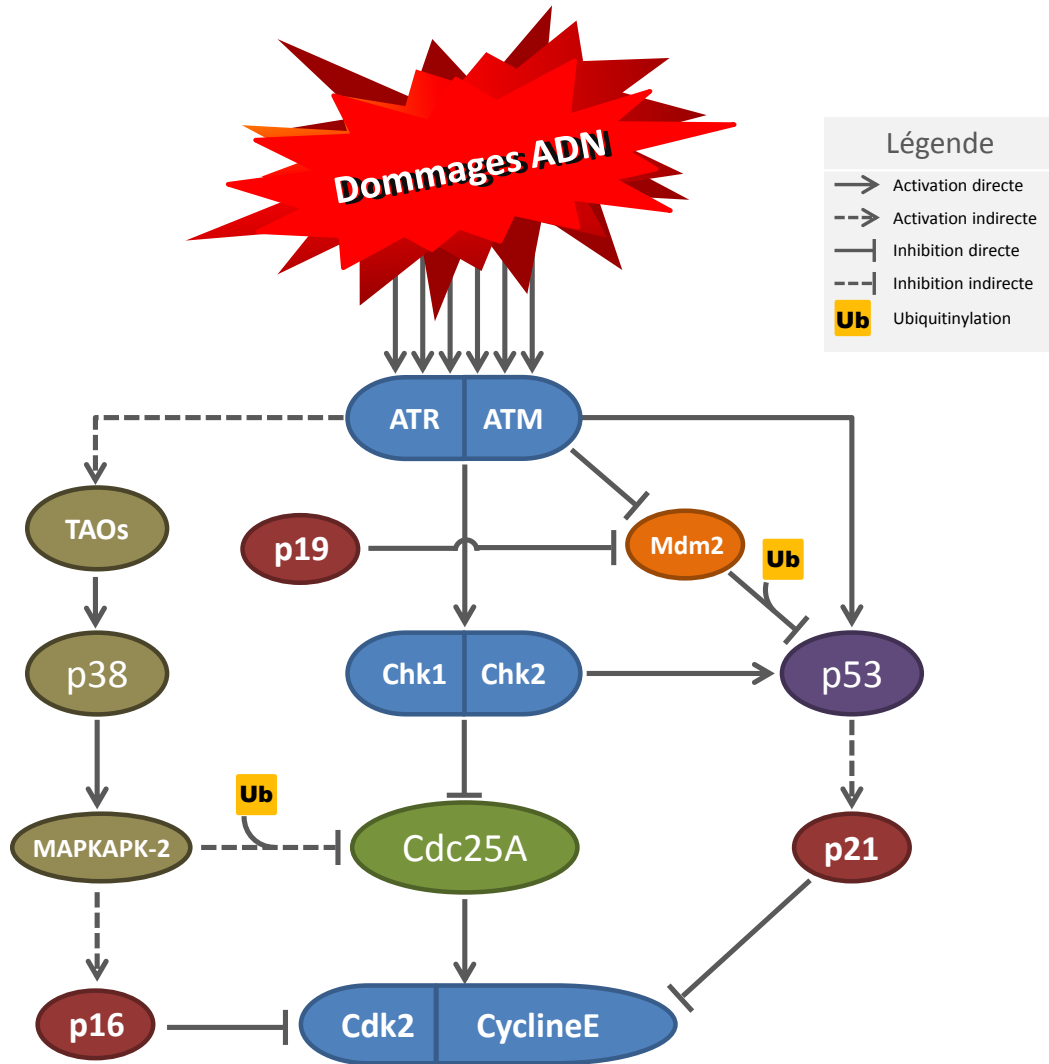
Les points de contrôle du cycle cellulaire constituent des points de vérification où la cellule s'arrête en cas de problèmes. Le cycle cellulaire comprend quatre points de contrôles dont trois en interphase (transition G<sub>1</sub>/S, Intra-S et transition G<sub>2</sub>/M). Les points de contrôle en interphase sont sensibles aux dommages à l'ADN. L'arrêt initié par ces points de contrôle permet à la cellule de réparer les dommages, de mourir le cas échéant ou encore de sénescer. Le point de contrôle en mitose, appelé SAC pour « spindle assembly checkpoint », est constitutivement activé en mitose depuis le début de la mitose jusqu'en anaphase. Le SAC restreint le passage en anaphase tant que les chromosomes ne sont pas tous alignés correctement sur la plaque équatoriale.



## **Le point de contrôle à la transition G<sub>1</sub>/S**

Le point de contrôle à la transition G<sub>1</sub>/S, schématisé à la Figure 8, bloque par trois axes de signalisation distincts, l'activation des complexes Cdk2-CyclineE nécessaires au passage des cellules en phase S. La première voie en importance conduit à l'inactivation CHK1/CHK2-dépendante de la phosphatase Cdc25A via la voie de dégradation protéasomale [179, 180]. Cdc25A phosphorylé sur la S76 par CHK1 est exportée dans le cytoplasme et phosphorylée sur la S82 par une kinase encore non identifiée. La phosphorylation de Cdc25A sur S82 permet sa reconnaissance par l'E3 ubiquitine ligase SCF<sup>β-TRCP</sup>, conduisant à sa dégradation rapide par le protéasome [180-182]. En réponse à l'irradiation, Cdc25A est aussi phosphorylée sur la S123 par CHK2, un événement qui conduit également à sa dégradation protéasomale [183]. La seconde voie de signalisation du point de contrôle à la transition G<sub>1</sub>/S transite par l'activation du facteur de transcription suppresseur de tumeur p53. En réponse à des CDBs de l'ADN ou des stress réplcatifs, p53 est activé par les kinases CHK1 et CHK2, mais aussi directement par les PI3 kinases ATR et ATM en amont. De plus, ATM et ATR régulent négativement l'ubiquitine ligase E3 Mdm2, responsable de la dégradation protéasomale de p53 [184]. Ainsi, en réponse aux lésions de l'ADN, p53 est non seulement activé, mais également stabilisé, ce qui augmente sa capacité de transactivation. p53 freine la progression du cycle cellulaire à la transition G<sub>1</sub>/S en transactivant le gène p21<sup>Cip/Kip</sup>, qui bloque l'activité kinase des complexes Cdk2-CyclineE [8]. La 3<sup>ème</sup> voie d'activation du point de contrôle en G<sub>1</sub>/S passe par la voie p38/SAPK (Sress-activated protein kinase) qui est activée par les lésions de l'ADN causées par le rayonnement UV et par les stress osmotique et thermique [185]. Dans cette cascade d'activation, ATR et ATM activent indirectement TAO, une kinase activatrice de la voie p38 qui, par l'entremise de la kinase MAPKAPK-2, inactive la phosphatase Cdc25A. Cdc25A phosphorylée par MAPKAPK-2 est alors exportée hors du noyau, ubiquitinylée puis dégradée par le protéasome 26S [186, 187]. Il est également intéressant de noter que l'activation de p38 renforce l'arrêt au point de contrôle par un mécanisme parallèle. En effet, l'activation de la voie p38 augmente l'expression des protéines p16<sup>INK4a</sup> et p19<sup>ARF</sup> qui sont respectivement des inhibiteurs des complexes Cdk2-CyclineE et de Mdm2 [188-190]. Ainsi, non seulement l'activation de la voie p38/SAPK conduit à l'inactivation

MAPKAPK-2-dépendante de Cdc25A, mais elle contribue également à renforcer le blocage du cycle en modulant positivement p21<sup>Cip/Kip</sup>, un inhibiteur des complexes Cdk2-CyclineE dont le gène est transactivé par p53.

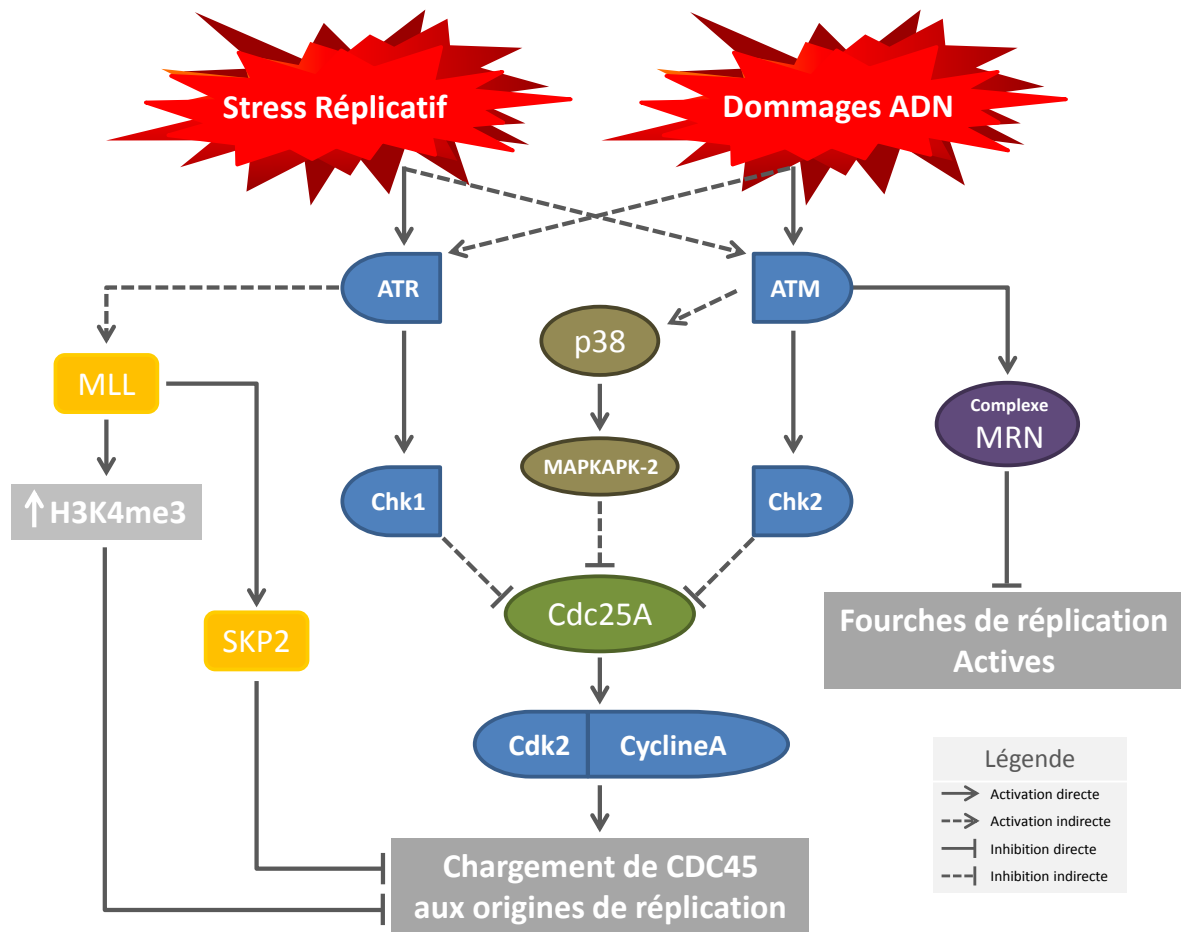


**Figure 8 : Signalisation du point de contrôle à la transition G<sub>1</sub>/S.**

Le point de contrôle à la transition G<sub>1</sub>/S, activé par des dommages à l'ADN, restreint la progression des cellules vers la phase S du cycle cellulaire en inhibant l'activité du complexe Cdk2-CyclineE par trois axes de signalisation. Ces axes, soit ATM-CHK2, ATR-CHK1, p38/SAPK bloquent le cycle cellulaire en inhibant la phosphatase Cdc25A et en transactivant la protéine p21<sup>Cip/Kip</sup>, un inhibiteur du cycle cellulaire, via l'activation du suppresseur de tumeur p53. ATM et ATR renforcent l'activation de p53 en inhibant l'ubiquitine-ligase E3 Mdm2, qui envoie p53 vers la voie de dégradation protéasomale.

## **Le point de contrôle Intra-S**

L'activation du point de contrôle intra-S par les insultes génotoxiques est généralement transitoire. Ce point de contrôle, illustré à la Figure 9, régule négativement l'échafaudage de nouvelles origines de réplication et stabilise les origines de réplication arrêtées par des bris de l'ADN, évitant ainsi la génération de CDBs. Les effecteurs de cette stabilisation des origines de réplication demeurent encore obscurs. La mécanique moléculaire de l'arrêt intra-S présente une similitude avec celle du point de contrôle à la transition G<sub>1</sub>/S en ce qui a trait à la régulation négative de la phosphatase Cdc25A. En réponse à des stress réplcatifs, la phosphatase Cdc25A est dégradée par le protéasome. En conditions normales, Cdc25A est nécessaire à l'activation des complexes Cdk2-CyclineA qui permettent la progression de la phase S. L'activité de Cdk2-CyclineA est importante en phase S pour le chargement du facteur de réplication Cdc45 sur la chromatine. Cdc45 est nécessaire au recrutement de l'ADN polymérase  $\alpha$  sur les complexes protéiques de pré-réplication et l'inhibition de Cdk2-CyclineA bloque l'initiation de la réplication aux origines de réplication néo-formées [7, 191]. Une autre voie d'importance dans l'inhibition du chargement de Cdc45 sur la chromatine est la phosphorylation de la méthyl-lysine transférase MLL (Mixed lineage leukemia) par ATR. MLL ainsi phosphorylée est stabilisée et catalyse la méthylation de la lysine 4 sur l'histone H3 aux origines de réplication ce qui empêche le recrutement de Cdc45 [192, 193]. En parallèle, la phosphorylation de MLL par ATR empêche l'interaction entre MLL et la protéine SKP2 (S-phase kinase-associated protein 2) qui conduit à la stabilisation de SKP2. SKP2 est un inhibiteur de l'activité kinase du complexe Cdk2-CyclineA [194]. Suite à des CDBs de l'ADN en phase S, ATM et CHK2, phosphorylent aussi une foule de substrats nécessaires à l'activation et la stabilité du point de contrôle. Ces substrats incluent les protéines BRCA1 [195] et FANCD2 [196]. Un autre substrat important d'ATM est la protéine Nbs1 qui fait partie du complexe MRN (Mre11, Nbs, Rad50). Nbs1 phosphorylé par ATM recrute la protéine SMC1 qui, phosphorylée à son tour par ATM régule négativement la progression des fourches de réplication de l'ADN et participe à au processus de réparation [43].



**Figure 9 : Signalisation du point de contrôle intra-S.**

La principale cible du point de contrôle intra-S est la phosphatase Cdc25A, le principal activateur du complexe Cdk2-CyclineA dont l'activité est nécessaire à la progression en phase S. En présence d'un stress réplcatif ou de dommages à l'ADN, Cdc25A est inactivée par les voies ATR-CHK1, ATM-CHK2 et ATR-p38. L'inactivation de la phosphatase Cdc25A par ces voies conduit à l'inactivation du complexe Cdk2-CyclineA et freine la progression en phase S. Deux autres voies contribuent à bloquer la progression des cellules en S soit la voie ATM-complexe MRN qui inhibe la progression des fourches de réplication actives et la voie ATR-MLL qui empêche la formation de nouvelles origines de réplication en bloquant le recrutement de CDC45 sur la chromatine. CDC45 est nécessaire au recrutement ultérieur de l'ADN polymérase.

### **Le point de contrôle à la transition G<sub>2</sub>/M**

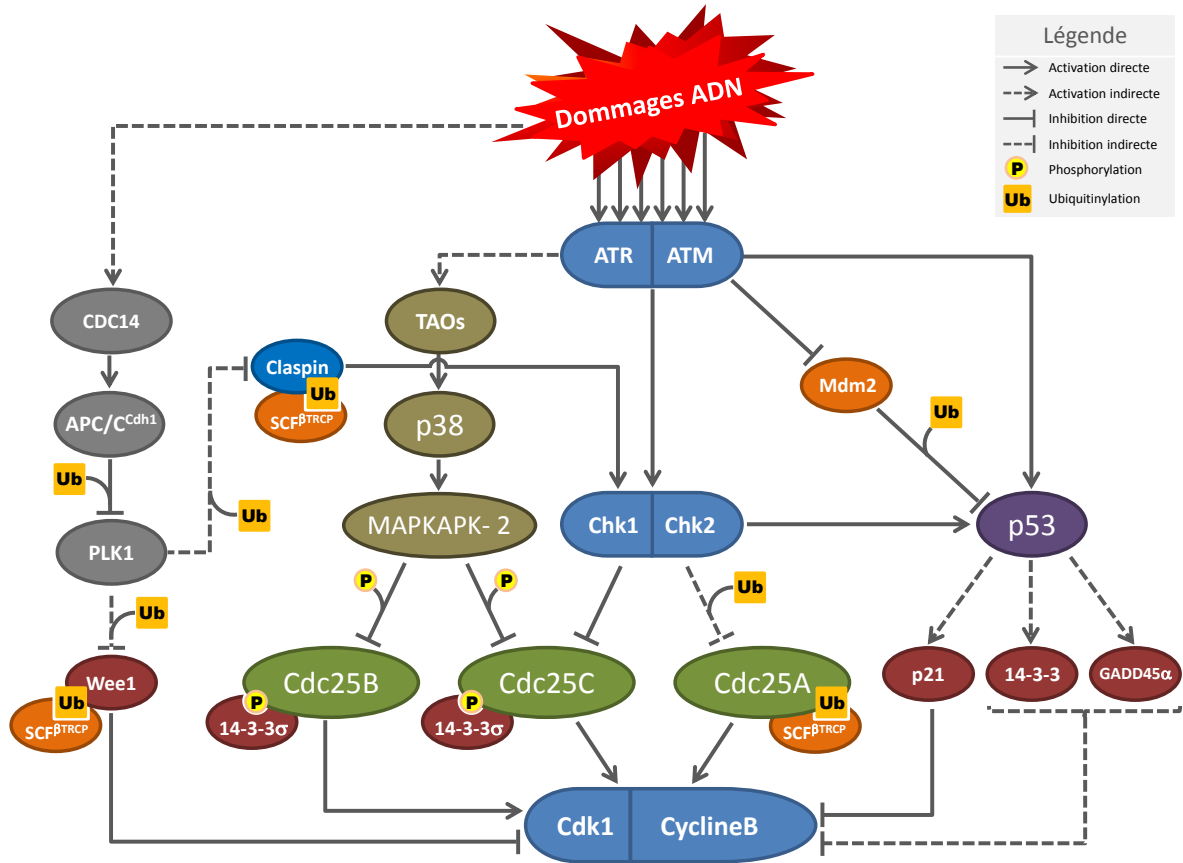
En réponse à des dommages à l'ADN en phase G<sub>2</sub> ou la présence d'ADN non répliqué, l'activation du point de contrôle à la transition G<sub>2</sub>/M conduit à l'inhibition du complexe Cdk1-CyclineB par quatre axes de signalisation distincts (Figure 10). Ces axes

sont définis par les voies impliquant ATM-CHK2, ATR-CHK1, p38-MAPKAPK2 et CDC14-APC/C<sup>Cdh1</sup>.

En réponse à des lésions de l'ADN en phase G2, l'activation simultanée des voies ATM-CHK2 et ATR-CHK1 va conduire à la phosphorylation des phosphatases Cdc25 A et C qui activent le complexe Cdk1-cyclineB. La phosphorylation par CHK1 de Cdc25A sur la T76 conduit la protéine à la dégradation protéasomale. La phosphorylation du résidu S216 de Cdc25C par CHK1 et CHK2 crée un phosphosite reconnu par la protéine chaperonne 14-3-3 $\sigma$  qui séquestre Cdc25C dans le compartiment cytoplasmique et la tiens à l'écart de son substrat Cdk1-CyclineB [179, 197]. L'activation de p53 par ATM et CHK2 conduit également à la transactivation des gènes p21<sup>Cip/Kip</sup>, 14-3-3 $\sigma$  et GADD45 $\alpha$ . L'augmentation de l'expression de ces trois protéines renforce l'inhibition du complexe Cdk1-CyclineB et freine la progression des cellules en mitose. [198]. Parallèlement aux voies ATM-CHK2 et ATR-CHK1, la voie p38-MAPKAPK2 peut aussi être activée dans certaines conditions. Cette voie conduit à la phosphorylation de Cdc25B sur les résidus S309/S323 et de Cdc25C sur la S216 causant leur séquestration dans le compartiment cytoplasmique par les protéines 14-3-3 $\sigma$  [199].

Finalement, en plus des voies canoniques de la réponse aux dommages à l'ADN, l'activation d'une autre voie impliquant la translocation de la phosphatase CDC14 des nucléoles vers le nucléoplasme va conduire à la régulation négative de la kinase mitotique Plk1. CDC14 est un activateur de l'ubiquitine ligase E3 APC/C<sup>Cdh1</sup> responsable de la dégradation de Plk1 par le protéasome 26S [200]. Plk1, en condition normale, participe à l'activation du complexe Cdk1-CyclineB, entre autres, en inhibant la kinase Wee1. PLK1 est également un régulateur négatif de CHK1 par la phosphorylation du cofacteur Claspin, qui dès lors est reconnu par l'ubiquitine ligase E3 SCF <sup>$\beta$ -TRCP</sup> et dégradé. Ainsi, la voie CDC14-APC/C<sup>Cdh1</sup> contribue à inhiber l'activité du complexe Cdk1-CyclineB via l'inhibition de Plk1. Il est intéressant également de noter que la kinase CHK1 peut aussi phosphoryler directement Wee1. Cette phosphorylation permet la reconnaissance de Wee1 par la protéine 14-3-3 $\sigma$ . À l'instar des phosphatases Cdc25, qui sont inhibées par les protéines 14-3-3, l'association de Wee1 avec 14-3-3 $\sigma$  en stimule son activité [80, 201].

Cette interaction, favorisée par l'expression p53-dépendante du gène 14-3-3 $\sigma$ , augmente de surcroît l'activité kinase de Wee1. L'augmentation p53-dépendante de 14-3-3 $\sigma$  et la dégradation CDC14-APC/C<sup>Cdh1</sup>-dépendante de Plk1 renforcent donc l'inhibition du complexe Cdk1-CyclineB et contribuent ainsi à bloquer la transition G2/M du cycle cellulaire.



**Figure 10 : Signalisation du point de contrôle à la transition G<sub>2</sub>/M.**

Le point de contrôle à la transition G<sub>2</sub>/M, activé par des dommages à l'ADN, restreint la progression des cellules en mitose en inhibant l'activité du complexe Cdk1-CyclineB par quatre voies distinctes. Ces quatre voies, ATM-CHK2, ATR-CHK1, p38/SAPK et CDC14 bloquent le cycle cellulaire en inhibant l'activité du complexe Cdk1-CyclineB. Ainsi, les voies ATM-CHK2 et ATR-CHK1 aboutissent à l'inhibition des phosphatases activatrices Cdc25A et C. Cette voie renforce l'activation de p53 qui transactive les inhibiteurs p21, 14-3-3 et GADD45a. ATM et ATR peuvent également activer p53 en inhibant Mdm2, une ubiquitine-ligase E3 inhibitrice de p53. La voie p38/SAPK, dont l'activation dépend d'ATM et ATR, inhibe quant à elle les phosphatases activatrices Cdc25B et C. Finalement, l'activation indirecte de la phosphatase CDC14 par les dommages à l'ADN conduit à l'inhibition de Wee1, un inhibiteur du complexe Cdk1-CyclineB, et à l'activation de CHK1, renforçant le signal d'inhibition du complexe Cdk1-CyclineB.

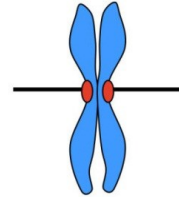
## **Le point de contrôle en mitose ou « spindle assembly checkpoint » (SAC)**

Le « Spindle Assembly Checkpoint » ou SAC prend place à la transition entre la métaphase et l'anaphase de la mitose. Ce point de contrôle veille à ce que les chromatides sœurs des chromosomes dupliqués soient distribuées de façon équitable entre les cellules filles lors de la division cellulaire. Lorsque le SAC est insatisfait, il bloque les cellules en prométaphase-métaphase tandis que lorsqu'il est satisfait, il devient permissif à leur progression en anaphase. Pour que le SAC soit satisfait et que la cellule puisse entrer en anaphase, tous les kinétochores (Kt) des chromatides sœurs doivent être liés par des microtubules (Mt) émanant des pôles opposés du fuseau mitotique et les chromatides sœurs positionnées sur la plaque équatoriale [202-205]. Dans cette position, les chromatides sœurs sont dites « bi-orientées ». Les kinétochores sont des structures protéiques lamellaires échafaudées sur les centromères des chromosomes et permettent la capture des chromatides sœurs par les microtubules [206].

Comme l'interaction entre les kinétochores et les microtubules est aléatoire et très dynamique, plusieurs modes d'attachement peuvent être observés (Figure 11). L'attachement correct des Kt aux Mt émanant des pôles mitotiques opposés est qualifié d'attachement amphitélétique (11A). Pour atteindre ce stade, l'attachement des chromatides sœurs passe par un stade transitoire appelé attachement « monotélétique » qui signifie qu'un seul des deux kinétochores est capturé par des microtubules (11B). Évidemment, de par la nature aléatoire et très dynamique des interactions Kt-Mt, des aberrations se produisent. Lorsque les Kt de deux chromatides sœurs sont capturés par des Mt émanant du même pôle, cet attachement erroné est qualifié de « syntélétique » (11C). Dans certains cas, on observe également des attachements « mérotéliques » qui impliquent l'attachement d'un même Kt aux microtubules émanant des pôles opposés (11D). Ces deux derniers types d'attachement peuvent générer, après l'anaphase, deux cellules filles dont le nombre de chromosomes est aneuploïde ( $2n+1$  et  $2n-1$ ).

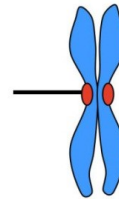
**(A) Attachement amphitélisque**

SAC satisfait  
Passage en anaphase



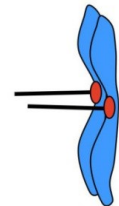
**(B) Attachement monotélisque**

SAC insatisfait  
Blocage en prométaphase/métaphase



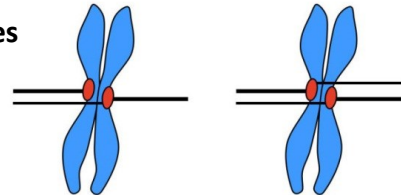
**(C) Attachement syntélisque**

SAC insatisfait  
Blocage en prométaphase/métaphase



**(D) Attachements mérotéliques**

Généralement indétecté  
par le SAC  
Passage en anaphase possible



Adaptation du site <http://www.celldiv.com>

**Figure 11 : Modes d'attachement des chromatides sœurs en mitose.**

La capture des kinétochores des chromatides sœurs par les microtubules donne lieu à plusieurs configurations d'attachements, qui peuvent être problématiques. A) L'attachement amphitélisque, où les kinétochores des deux chromatides sœurs sont liés par des Mt issus des pôles opposés de la cellule, permet la satisfaction du SAC et le passage en anaphase. B) L'attachement monotélisque se produit lorsqu'un seul des deux kinétochores est capturé par le fuseau mitotique. Ce mode d'attachement est activateur du SAC. C) L'attachement syntélisque a lieu lorsque les deux kinétochores d'une paire de chromatides sœurs sont liés par des Mt issus du même pôle mitotique. Cette configuration conserve le SAC dans un état insatisfait et bloque la cellule en métaphase. D) L'attachement mérotélisque se produit alors qu'un où les deux kinétochores d'une paire de chromatides sœurs sont liés à la fois par des Mt issus des deux pôles opposés du fuseau mitotique. Ce mode d'attachement est indétecté par les cellules qui passent tout de même en anaphase. L'attachement mérotélisque, génère alors du « lagging chromosomes » et est suspecté d'être une cause d'instabilité génomique.



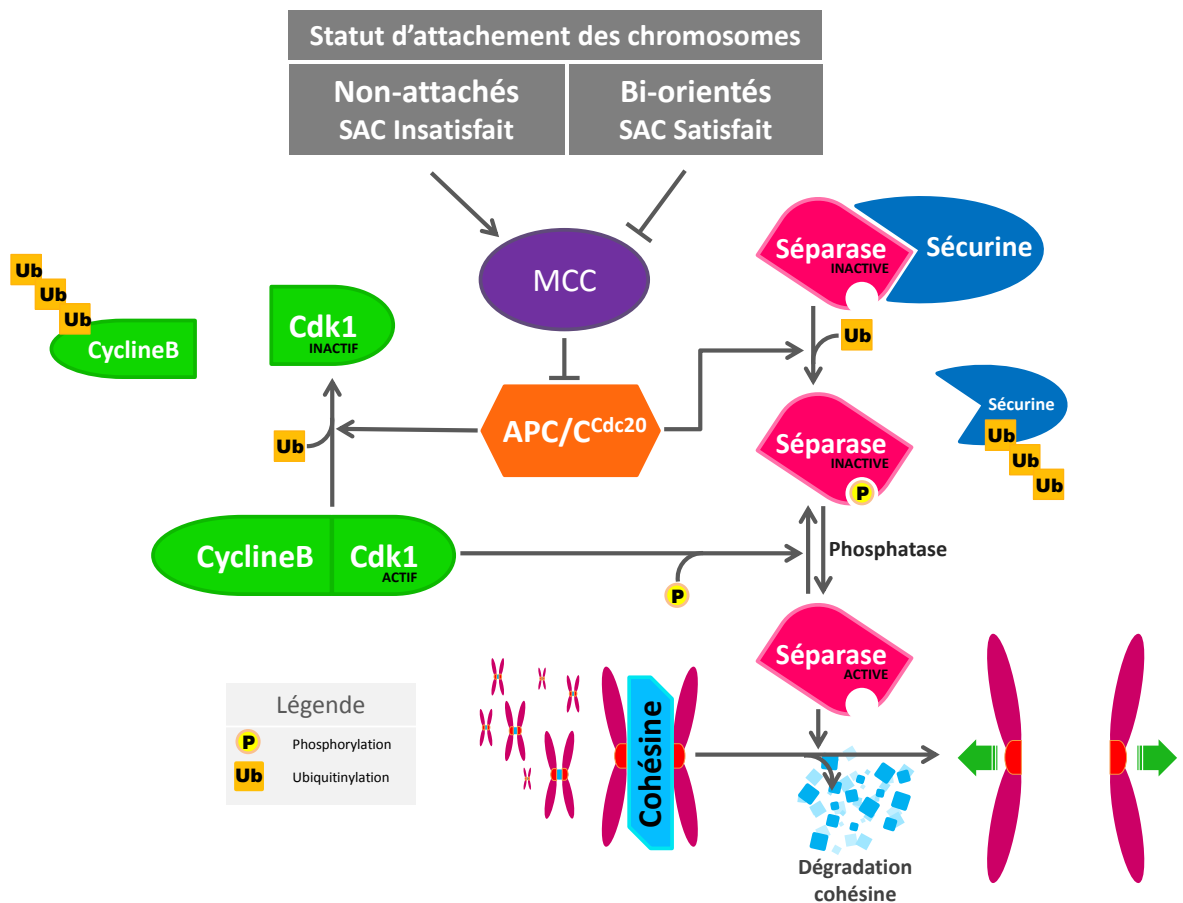
Dans les cellules, heureusement, la plupart des liaisons Kt-Mt aberrantes sont reconnues et les cellules activent le SAC qui empêche la progression en anaphase jusqu'à ce que deux critères stricts soient satisfaits : 1) tous les Kt doivent être liés à des Mt émanant des pôles mitotiques opposés et 2) le lien entre les Kt des chromatides sœurs et les Mt doit être sous tension. Généralement, le SAC est très restrictif et un seul kinétochore libre est suffisant pour maintenir son activité et inhiber la transition métaphase-anaphase. Il est à noter que la liaison mérotélique est plus problématique pour les cellules puisqu'elle n'est généralement pas détectée et ne conduit pas à l'activation du SAC. Cela peut s'expliquer par le fait que dans la liaison mérotélique, un même Kt est lié à des Mt venant des pôles opposés, ce qui permet une tension suffisante au niveau du Kt pour satisfaire le SAC (Figure 11D). Il en résulte que la cellule entre en anaphase avec un chromosome mérotélique qui, tiré en même temps vers les deux pôles opposés du fuseau mitotique, se retrouve coincé au niveau du sillon de clivage donnant lieu au phénomène de « lagging chromosome » [207]. Ultiment, ce chromosome va être littéralement broyé par l'étranglement du sillon de clivage en cytokinèse. Cela va générer deux cellules filles qui possèdent 2n chromosomes plus ou moins des fragments du chromosome mérotélique, qui vont être réintégrés dans le noyau principal ou bien dans un micronuclei néoformé. Bien que ce mécanisme puisse être générateur d'instabilité génomique, son potentiel de tumorigénicité demande encore à être appuyé par des évidences expérimentales [208, 209].

Les effecteurs majeurs du SAC sont les complexes MCC (Mitotic checkpoint complexes) constitués par les protéines Mad2, Mad3, Bub3, BubR1 et Cdc20 (Figure 12). Les complexes MCC sont formés au niveau des Kt non attachés ou mal attachés, et diffusent dans le cytoplasme pour inhiber l'ubiquitine ligase E3 APC/C<sup>Cdc20</sup> responsable de la transition métaphase-anaphase [210-216]. Lorsque le SAC est insatisfait, les complexes MCC inhibent Cdc20, un cofacteur essentiel du complexe ubiquitine ligase E3 APC/C<sup>Cdc20</sup> qui permet l'activation de la Séparase [217, 218].

La Séparase est l'enzyme responsable du clivage de la Cohésine qui maintient l'appariement des chromatides sœurs au niveau des centromères [219, 220]. Dans les cellules en prométaphase, la Séparase est inactivée par deux mécanismes : 1) par la Sécurine qui la séquestre et l'inactive [221-223] et 2) via une phosphorylation inhibitrice

catalysée par le complexe Cdk1-CyclineB [224, 225] (Figure 12). Lorsque les chromosomes dupliqués sont parfaitement alignés sur la plaque équatoriale et que le SAC est satisfait, le cyclosome APC/C<sup>Cdc20</sup> active la Séparase en poly-ubiquitinylant la Sécurine et la CyclineB pour entraîner leur dégradation par le protéasome 26S [226, 227]. Une phosphatase contribue également à l'activation de la séparase en retirant la phosphorylation inhibitrice catalysée par cdk1-cyclineB. Une fois activée, la Séparase clive la Cohésine, permettant ainsi la séparation des chromatides sœurs et le passage en anaphase (Figure 12). La transition métaphase/anaphase de la mitose est marquée par la dégradation de la CyclineB et l'inhibition du complexe Cdk1-CyclineB.

Après ces explications, il peut paraître étrange de parler de « Spindle assembly checkpoint » (SAC) puisqu'en réalité le point de contrôle s'attarde davantage au statut de l'attachement Kt-Mt en prométaphase/métaphase plutôt qu'à l'assemblage du fuseau mitotique. En fait, le nom de ce point de contrôle est historique et a été conservé depuis les toutes premières expériences qui en ont révélé son existence en 1970 [228, 229]. Ces expérimentations ont, à l'aide de poisons des microtubules qui empêchent la formation normale du fuseau mitotique, mis en évidence des retards importants dans la progression des cellules en mitose. Évidemment, un fuseau mitotique altéré par ces drogues n'est pas en mesure de bien établir les liaisons Kt-Mt nécessaires à la satisfaction du SAC et il en résulte que les cellules demeuraient bloquées en prométaphase/métaphase. Le nom de SAC a toutefois été conservé en dépit de cette nouvelle compréhension afin d'éviter la confusion causée par des nomenclatures multiples pour un même phénomène.



**Figure 12 : Régulation moléculaire du point de contrôle en mitose (SAC).**

Le principal effecteur du point de contrôle en mitose est l'ubiquitine ligase E3 APC/Cyclosome Cdc20. L'APC/C Cdc20 active la séparase, enzyme responsable de la séparation des chromosomes. Lorsque les chromosomes ne sont pas tous liés par des microtubules au niveau de leurs kinétochores, le SAC est insatisfait et le complexe MCC formé au niveau des kinétochores libres inactive l'APC/C Cdc20, empêchant l'activation de la séparase. Dans le cas contraire où les chromosomes de la cellule sont tous liés par des microtubules sur leurs kinétochores, le SAC est satisfait, la formation du MCC est abrogée, l'APC/C Cdc20 peut alors activer la séparase. La séparase activée clive la Cohésine, la protéine qui maintient les chromatides sœurs dans un état apparié. Lorsque la Cohésine est clivée, les chromosomes se séparent et la cellule passe en anaphase.

## Les points de contrôle du cycle cellulaire et le cancer

### Points de contrôle et tumorigenèse

Les points de contrôle en interphase (G1/S, S, G2/M) du cycle cellulaire sont principalement activés en réponse aux dommages à l'ADN. Dans les dernières années, les voies de la RDA, lorsqu'elles fonctionnent bien, se sont imposées comme une barrière importante à la progression tumorale chez l'humain. La plupart des tumeurs et des lésions précancéreuses, contrairement aux tissus sains, présentent une activation constitutive des voies de la RDA et une surexpression de plusieurs de ses protéines constitutives telles qu'ATM, ATR, CHK1, CHK2,  $\gamma$ H2AX, BRCA1 et BRCA2. Un paradigme émergent est que ces voies, qui sont en apparence dérégulées, pourraient en fait être un frein à la transformation des cellules [230-232]. Le lien entre des voies altérées de la RDA et le cancer est connu depuis longtemps et a été vérifié par plusieurs groupes [88].

Des défauts dans les mécanismes d'activation ou de régulation des points de contrôle du cycle cellulaire contreviennent à une RDA optimale et à la réparation efficace des lésions de l'ADN. Par conséquent, l'accumulation de mutations au fil des divisions cellulaires, dues à des points de contrôle défaillants, peut conduire à la transformation progressive des cellules [230, 233, 234]. Ainsi, des mutations dans les gènes des kinases régulatrices de la RDA ont été retrouvées dans une grande variété de tumeurs humaines. Par exemple, des mutations dans ATM et CHK2 sont fréquemment retrouvées dans les tumeurs lymphatiques [235]. ATM, CHK2, BRCA1 et BRCA2 sont régulièrement altérés dans les cancers du sein [236, 237]. Les tumeurs ovariennes présentent couramment des altérations dans les gènes de CHK2, BRCA1 et BRCA2 [237, 238]. Des mutations de CHK2 sont rencontrées dans 50% des carcinomes colorectaux, dans plusieurs types de tumeurs prostatiques et chez les patients Li-Fraumeni p53-indépendants [7, 239, 240]. Il est intéressant de mentionner que des adaptations de la signalisation intracellulaire peuvent également conduire à des défauts dans l'activité des points de contrôles. Par exemple, des modifications post-traductionnelles aberrantes peuvent altérer la capacité d'effecteurs des points de contrôle à bloquer efficacement le cycle cellulaire. C'est le cas de p21<sup>Cip/Kip</sup>, qui

phosphorylé constitutivement dans plusieurs tumeurs, est séquestré hors du noyau et promeut la survie cellulaire des cellules cancéreuses [241].

Le point de contrôle mitotique (SAC) voit à ce que les chromosomes soient correctement attachés et partagés entre les deux cellules filles lors de la mitose. Le SAC assure une ségrégation équitable des chromosomes dupliqués lors de la division des cellules. Des problèmes dans fonctionnement ou la régulation du SAC causent des défauts de ségrégation des chromosomes qui peuvent générer de l'instabilité chromosomique (CIN) et potentiellement conduire à la transformation cellulaire et au développement tumoral [242].

### **Importance des points de contrôle dans les stratégies antitumorales**

L'arsenal thérapeutique utilisé pour vaincre le cancer est à ce jour dominé par des techniques radiologiques et l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques qui endommagent l'ADN. Ces techniques exploitent l'efficacité réduite des cellules cancéreuses à réparer leur ADN comparativement aux cellules saines. Par conséquent, dans les cellules tumorales qui ont une RDA généralement défailante, les lésions de l'ADN induit par les traitements vont préférentiellement conduire à la mort cellulaire. Bien que ces approches connaissent un certain succès, certaines cellules tumorales restent résistantes aux traitements et beaucoup reste à faire pour augmenter davantage l'efficacité des traitements actuels. Une stratégie présentement à l'étude est de rendre les cellules cancéreuses encore plus inaptes à répondre aux dommages à l'ADN en inhibant, au moyen d'agents chimiques, l'activité de protéines importante de la RDA dont les protéines régulatrices des points de contrôles du cycle cellulaire. Puisque la plupart des cellules cancéreuses ont une RDA altérée à divers niveaux, l'inhibition additionnelle d'un ou plusieurs joueurs important dans des voies de signalisation subsistante de la RDA représente une façon novatrice d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie et de la radiothérapie [243, 244].

### **La kinase CHK2**

La kinase CHK2 a originellement été décrite en tant que substrat principal de la PI3 kinase ATM, un détecteur de la réponse aux dommages à l'ADN. Bien que CHK2 partage

une spécificité de substrat commune avec CHK1, leurs structures et modes d'activation présentent des différences notables. CHK2 est activée par ATM dans un contexte de cassures double-brin (CDBs) de l'ADN tandis que CHK1 est préférentiellement activée par ATR en présence de cassures simple brin (CSBs) issues d'un stress répliatif. Bien que les voies ATM-CHK2 et ATR-CHK1 semblent présenter une certaine redondance, des différences importantes dans les fonctions inhérentes à CHK2 et CHK1 ont été démontrées, entre autres, par des études d'inactivation de gènes [7, 88, 245]. Premièrement, l'inactivation de CHK1 dans les cellules germinales de souris s'avère létale pour les embryons tandis que les souris CHK2<sup>-/-</sup> sont viables et paraissent normales [246-248]. Deuxièmement, l'inactivation de CHK1 dans les cellules somatiques par des approches de recombinaison homologue ou d'ARNs interférents conduisent à la mort rapide des cellules. Distinctivement, une inhibition de l'expression de CHK2 n'est pas létale et les cellules CHK2-déficientes prolifèrent normalement en culture [75, 249, 250]. Ces données suggèrent que CHK1 est le principal joueur dans la réponse aux dommages à l'ADN et que CHK2 aurait un rôle auxiliaire [7, 8].

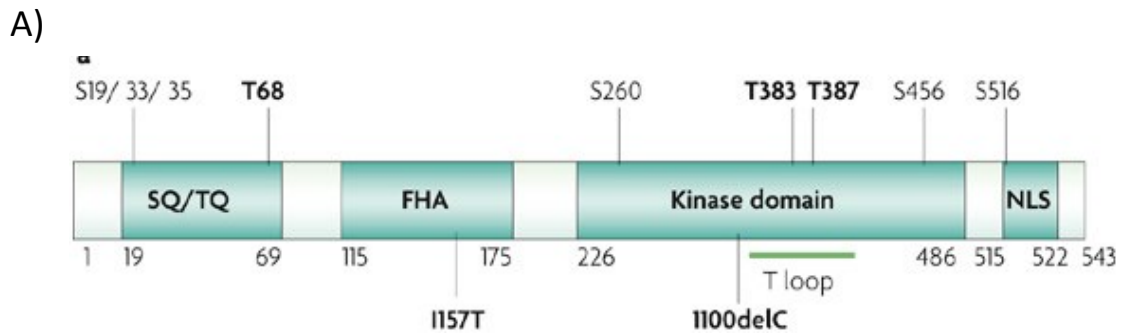
## **CHK2 et le cancer**

Plusieurs études ont identifié CHK2 comme étant un gène de susceptibilité au cancer qui est muté dans plusieurs cancers somatiques et aussi dans quelques cancers d'origine germinale. Les principaux organes touchés, bien qu'à basse fréquence, sont le sein, le tractus colorectal, la prostate, le cerveau, l'ovaire et le poumon [251, 252]. Les cancers du sein, du cerveau, les cancers colorectaux et ovariens sont principalement dus à la perte du locus de CHK2 sur le chromosome 22q13 alors que les cancers pulmonaires résulteraient d'une perte d'expression issue d'une répression épigénétique [253-256]. Également, la mutation I157T et la délétion 1100delC qui encode une protéine CHK2 tronquée exempte d'activité kinase, augmentent significativement le risque de développement d'un cancer du sein, de la prostate, de la glande thyroïde, de la rate, des reins, des ovaires et du tractus colorectal [238, 257-261]. Il est intéressant de noter que la perte de CHK2 est fréquemment observée dans les adénocarcinomes pulmonaires

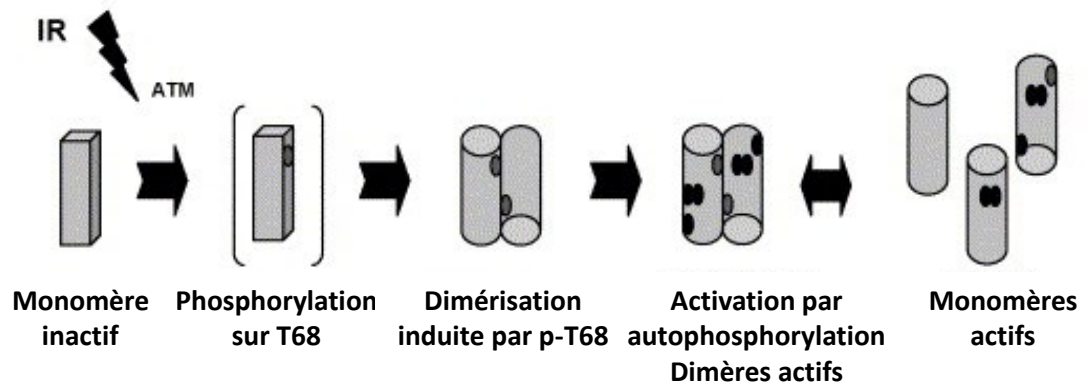
rencontrés en clinique et que ce type de cancer prédomine suite à l'induction expérimentale d'instabilité chromosomique chez la souris [262, 263].

## **Structure et activation de CHK2**

CHK2 est une sérine/thréonine kinase d'environ 66 kDa principalement exprimée dans le noyau des cellules en interphase [264-267]. Le gène CHK2 est constitué de 14 exons pouvant théoriquement conduire à plus de 90 isoformes différents, mais jusqu'à présent seulement neuf de ces isoformes ont été détectées dans les cellules sous forme d'ARN messagers [268]. La structure de CHK2 telle que schématisée à la Figure 13A, compte 3 domaines : un domaine N-terminal appelé le « SQ/TQ cluster domain » (SCD) riche en résidus SQ/TQ, un domaine Forkhead associated (FHA), le domaine kinase et finalement un motif de localisation nucléaire (NLS) en C-terminal [269]. Le domaine SCD contient sept sites SQ/TQ qui sont phosphorylés par les kinases ATM/ATR [270]. En réponse aux dommages à l'ADN, ATM phosphoryle CHK2 sur la T68 du domaine SCD ce qui initie son activation [21, 271, 272]. La séquence d'activation de CHK2 est schématisée à la Figure 13B. La phosphorylation initiale du domaine SCD crée un motif d'interaction avec le domaine FHA d'une autre molécule CHK2 [258], amenant les boucles d'activation des deux kinases à proximité. Il s'en suit une autophosphorylation croisée des résidus T383/T387 situés dans les sites catalytiques des deux protéines CHK2 dimérisées. L'autophosphorylation croisée conduit aussi à la phosphorylation des résidus S516 et T379 qui stimulent la dissociation des dimères CHK2 en monomères actifs [269, 273, 274].



B) *Extrait de l'article Nature Reviews Cancer 2007 December 7, 925-936*



*Extrait de l'article DNA Repair 2004, Volume 3, Issues 8-9, 1039-1047*

### Figure 13 : Structure et activation de la kinase CHK2.

CHK2 est une kinase constituée de plusieurs domaines qui sont nécessaires à son activation. A) CHK2 est composée d'un domaine riche en sérines et thréonines flanqués de glutamine (domaine SQ/TQ) en N-terminal comprenant la thréonine 68, un résidu important à son mécanisme d'activation. CHK2 est également constituée de domaines Forkhead (FHA), d'un domaine kinase ainsi que d'une séquence de localisation nucléaire (NLS). B) Le mode d'activation de CHK2 est caractérisé par une dimérisation de monomères CHK2 phosphorylés sur la T68 en réponse aux dommages à l'ADN. La dimérisation permet l'autophosphorylation croisée des monomères CHK2, conduisant à leur activation et à leur dissociation en monomères actifs.



## **Fonctions et substrats de CHK2**

La fonction de CHK2 dans la réponse des cellules aux dommages à l'ADN est acceptée dans la littérature bien que son rôle dans la RDA semble accessoire comparativement à celui de CHK1. De façon intéressante, un nouveau rôle de CHK2 a très récemment été proposé dans l'assemblage correct du fuseau mitotique au cours de la mitose, en absence de dommages à l'ADN [263].

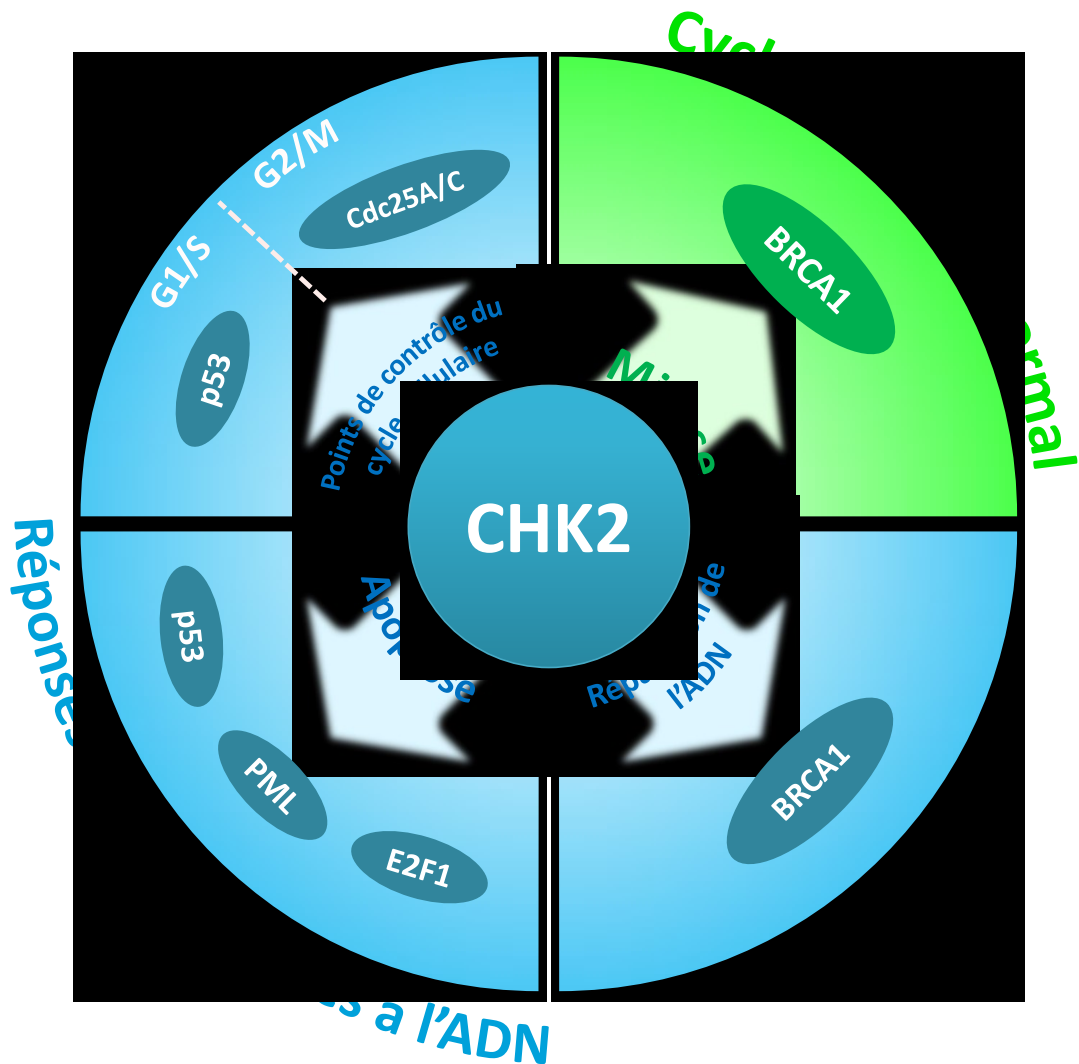
### **CHK2 dans la réponse aux dommages à l'ADN**

En réponse aux dommages à l'ADN, CHK2 phosphoryle plusieurs cibles *in-vivo* tel que les phosphatases Cdc25A et C, le suppresseur de tumeur BRCA1, la protéine pro-apoptotique PML ainsi que les facteurs de transcription p53, E2F1 et FoxM1 qui sont des protéines nécessaires à la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire, la mort cellulaire programmée (apoptose) et la réparation de l'ADN (Figure 14) [60, 82, 275-280]. La phosphorylation de Cdc25A sur la S123 par CHK2 conduit à sa dégradation protéasome-dépendante et freine la progression des phases G<sub>1</sub> et S en empêchant l'activation des complexes Cdk2-dépendants [181, 182, 275]. La phosphorylation de Cdc25C sur la S216 crée un site reconnu par la protéine chaperonne 14-3-3 $\sigma$  qui va séquestrer Cdc25C dans le cytoplasme pour l'empêcher d'activer le complexe Cdk1-CyclineB et arrêter la progression du cycle à la transition G<sub>2</sub>/M [1, 59, 276, 281]. La phosphorylation par CHK2 de BRCA1 sur la S988 conduit à sa dissociation des foyers de dommages à l'ADN. La forme soluble de BRCA1-pS988 soutient la réparation fidèle des CDBs par recombinaison homologue (HR) et réprime la réparation de l'ADN par NHEJ (non-homologus end joining) [60, 282, 283]. La phosphorylation de la protéine PML sur la S117 par CHK2 favorise quant à elle l'initiation du programme apoptotique [284]. En présence de dommages à l'ADN, CHK2 module également la réponse cellulaire à plus long terme en phosphorylant et stabilisant les facteurs de transcription p53(S20), E2F1(S364) et FoxM1(S361). La stabilisation de ces facteurs de transcription augmente la transactivation de gènes cibles impliqués dans la réparation de l'ADN, l'apoptose et les arrêts du cycle cellulaire [56, 279, 280, 285, 286]. Plus récemment, le rôle de CHK2 dans la stabilisation de p53 a été remis en question par des investigations conduites chez la souris et dans des

systèmes de lignées cellulaires cancéreuses  $CHK2^{-/-}$ . Ces études ont démontré que la stabilisation de p53 en réponse aux dommages à l'ADN était  $CHK2$ -indépendante. Ainsi, l'incongruité de ces données démontre une fois de plus que  $CHK2$  n'est pas un joueur essentiel de l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN et que son importance dans la RDA peut varier significativement d'un système à l'autre [250, 287, 288].

### **Rôle de $CHK2$ en mitose**

Une étude très récente montre que  $CHK2$  contribue à la maintenance de l'intégrité chromosomique *en absence* de dommages à l'ADN (Figure 14) [263]. Cette nouvelle fonction de  $CHK2$  est d'importance puisque l'instabilité chromosomique (CIN), définie comme la perte ou le gain perpétuel de chromosomes, est une caractéristique commune des cellules cancéreuses humaines qui contribue aux phénomènes de tumorigenèse et de progression tumorale [289]. Les auteurs de cette étude ont mis en évidence un rôle de  $CHK2$  dans la formation du fuseau mitotique nécessaire à la bi-orientation des chromosomes et la séparation équitable du matériel chromosomique au cours de la mitose [263]. Cette nouvelle fonction de  $CHK2$  en mitose explique l'augmentation de l'instabilité chromosomique observée dans les cellules humaines HCT116  $CHK2^{-/-}$  [263]. Par ailleurs, dans cette étude, les auteurs démontrent que cette fonction de  $CHK2$  passe par la phosphorylation de BRCA1 sur la S988. De façon intéressante, et consolidant l'idée d'un rôle mitotique pour BRCA1, d'autres études ont mis en évidence une localisation centrosomale de BRCA1 dans des cellules en mitose et suggèrent que BRCA1 pourrait réguler l'intégrité des centrosomes mitotiques en modulant l'ubiquitylation *in situ* de la  $\gamma$ -tubuline [290, 291].



**Figure 14 : Fonctions et substrats de CHK2.**

CHK2 est une kinase bien connue de la réponse aux dommages à l'ADN qui participe à la transduction du signal jusqu'aux effecteurs de la réponse. En réponse aux dommages à l'ADN, CHK2 peut favoriser la réparation de l'ADN en phosphorylant BRCA1, conduire la cellule en apoptose en modulant l'activité des protéines p53, PML et E2F1 et activer les points de contrôle du cycle cellulaire en phosphorylant p53 et les phosphatases Cdc25. Plus récemment, un nouveau rôle a été suggéré pour CHK2 dans la régulation de la mitose en absence de dommages à l'ADN où CHK2 en phosphorylant BRCA1 sur la S988 participerait à la régulation de la formation du fuseau mitotique.

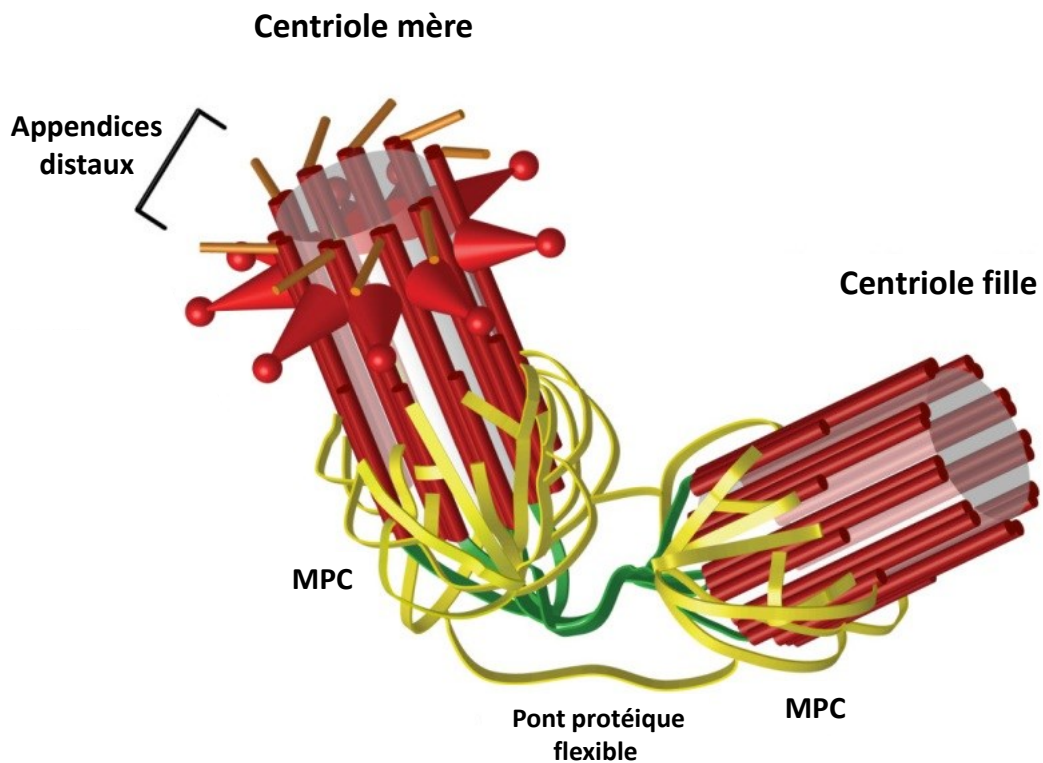
## **Les centrosomes**

Les centrosomes sont de petites organelles périnucléaires dont le diamètre est environ 1-2  $\mu\text{m}$ . Ces organelles jouent plusieurs rôles d'importance dans la cellule dont la nucléation et l'organisation des microtubules (d'où leur nom de « microtubule organizing centers » ou MTOC), la formation et la motilité des cils/flagelles dans les cellules différenciées (bactéries, cellules épithéliales ciliées, spermatozoïdes, etc.), et la formation et l'organisation du fuseau mitotique. De plus, un grand nombre de protéines participant à la régulation du cycle cellulaire et la réponse aux dommages à l'ADN a été localisé aux centrosomes, supportant l'idée que les centrosomes servent aussi de centres d'intégration des voies de signalisation qui régulent le cycle cellulaire et la réponse aux dommages à l'ADN.

### **Anatomie et structure du centrosome**

Le centrosome, dont la structure est schématisée à la Figure 15, est un amalgame d'un grand nombre de protéines qui se regroupent dans deux zones distinctes : les centrioles et la matrice péricentriolaire (MPC). Les centrioles, au nombre de deux, constituent le cœur du centrosome et sont composés d'un arrangement radial et symétrique de neuf groupes de microtubules (Mt). Ces groupes de Mt sont organisés en doublets dans la partie distale du centriole et en triplets dans sa partie proximale. Les deux centrioles, qui sont perpendiculaires l'un par rapport à l'autre, sont reliés par leurs extrémités proximales via un pont protéique flexible. Les régions proximales des centrioles sont responsables du recrutement des protéines qui composent la MPC tandis que les parties distales s'ancrent à la membrane plasmique. Les deux centrioles qui composent le centrosome sont asymétriques : le « centriole mère » est plus long et possède des appendices protéiques dans sa partie distale. Les appendices de ce centriole sont responsables de l'ancrage du centrosome au niveau de la membrane plasmique. Le second centriole, plus court et exempt d'appendices, est le « centriole fille ». La MPC elle est constituée de couches de protéines qui partagent une structure coiled-coil caractéristique. Ces couches protéiques, sont entre autres responsables de la nucléation des microtubules et du recrutement de protéines régulatrices de phénomènes tels que maturation des centrosomes et la nucléation des

microtubules par exemple. La  $\gamma$ -tubuline, au sein des complexes  $\gamma$ -TuRC ( $\gamma$ -tubulin ring complex) qui se trouvent dans la MPC, permet l'ancrage des extrémités (-) des Mt aux centrioles [292-297]. Il est aussi important de mentionner que la MPC est le site d'assemblage des procentrioles lors de la duplication des centrosomes en phase S et qu'elle varie énormément en taille et en composition selon les phases du cycle cellulaire.



*Adapté de l'article Sillibourne and Bornens, Cell Division 2010 5:25*

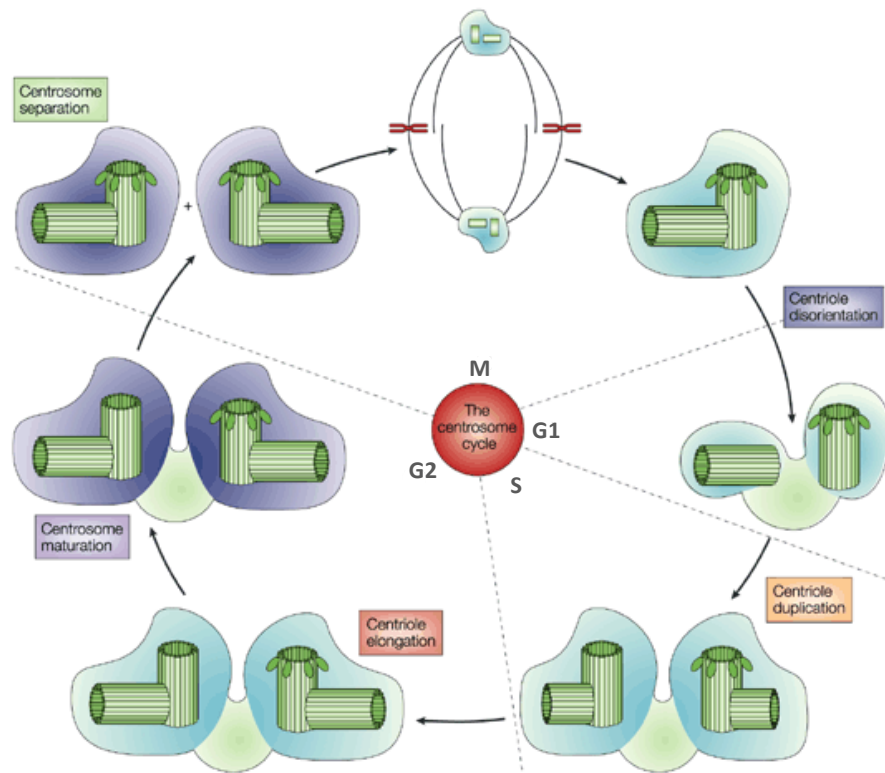
**Figure 15 : Structure du centrosome.**

Le centrosome est une petite organelle d'environ 1 micron composée de deux centrioles, un centriole mère et un centriole fille. Les centrioles mère et fille sont reliés par un pont protéique flexible. Chaque centriole recrute un grand nombre de protéines, dont la  $\gamma$ Tubuline formant la matrice péri-centriolaire (MPC). Le centriole mère possède des appendices distaux permettant l'ancrage du centrosome à la membrane plasmique. Le centrosome joue un rôle de premier plan dans l'organisation du squelette de microtubules et la formation du fuseau mitotique. C'est d'ailleurs ces rôles qui ont valu aux centrosomes le nom de « Microtubule Organizing Center » ou MTOC.

## **Le cycle de duplication des centrosomes**

La duplication des centrosomes, dont la séquence est illustrée à la Figure 16, a lieu en même temps que la réplication des chromosomes en phase S et permet ultimement la transmission d'un centrosome à chacune des cellules filles durant la mitose. De plus, la duplication des centrosomes est nécessaire au bon déroulement de la mitose, car les centrosomes dupliqués vont constituer les pôles opposés du fuseau mitotique [298-300]. Par conséquent, la duplication des centrosomes est régulée précisément durant le cycle cellulaire. En phase G<sub>1</sub> du cycle, la cellule ne possède qu'un seul centrosome qui joue son rôle de MTOC. Lorsque la cellule progresse en phase S, le centrosome est dupliqué de façon concomitante avec la réplication des chromosomes [300-303]. En fin de phase G<sub>1</sub>, les centrioles mère et fille qui étaient alors perpendiculaires et intimement reliés, se dissocient. Ce phénomène, appelé « centriole disorientation », est considéré comme une étape de non-retour dans la duplication centrosomale et permet à chaque centriole d'initier la nucléation perpendiculaire d'un procentriole fille. La duplication des centrioles est un processus semi-conservatif où le centriole dupliqué sert de modèle à la constitution du procentriole naissant. Comme la réplication de l'ADN en phase S, la réplication des centrioles est régie par les complexes Cdk2-CyclineE/A [302, 304-309]. Il est important de mentionner ici, qu'en tout temps pendant ces changements, les deux centrioles dissociés demeurent reliés par le pont protéique flexible. Le début de la phase G<sub>2</sub> est marqué par l'élongation des procentrioles et le début de la phase de « maturation » des centrosomes. Cette phase est caractérisée par une augmentation significative du volume centrosomal résultant du recrutement actif et accéléré d'une panoplie de protéines à la MPC. En interphase, la grande majorité de la  $\gamma$ -tubuline est sous forme soluble dans le cytoplasme et dépourvue d'activité de nucléation des Mt. En début de mitose, le pont protéique entre les centrosomes est rompu pour permettre aux centrosomes dupliqués de migrer aux pôles de la cellule et la MPC recrute une grande quantité de  $\gamma$ -tubuline. Ce recrutement massif de la  $\gamma$ -tubuline et de kinases et phosphatases régulatrices coïncide avec une augmentation significative de la nucléation des Mt aux centrosomes [310-312]. En mitose, les deux centrosomes générés au cours des phase S et G<sub>2</sub> vont constituer les deux pôles mitotiques d'où l'importance centrale des centrosomes en mitose [313]. Au début de la phase G<sub>1</sub> subséquente, le centriole

filles originales développent les appendices distaux et deviennent un centrosome mère. Au fait de ces étapes, il apparaît donc clair que la duplication, la séparation et la maturation correctes des centrosomes sont des événements cruciaux à la formation du fuseau mitotique, la ségrégation équitable du matériel génétique et donc la stabilité génomique des cellules [311, 314-316].



Extrait de l'article *Nature Reviews Cancer* 2, 815-825 (Novembre 2002)

### Figure 16 : Cycle de duplication des centrosomes.

Le cycle de duplication des centrosomes suit précisément la progression du cycle cellulaire. En G1, les cellules ne possèdent qu'un seul centrosome dont les deux centrioles sont intimement reliés par le pont protéique flexible. À la mi-G1, les deux centrioles composant le centrosome se séparent en demeurant reliés par le pont protéique flexible. Les centrioles sont dupliqués en phase S où chaque centriole initie la nucléation d'un nouveau centriole fille. À partir de la phase S, la cellule possède donc deux centrosomes. En G2, il y a élongation des centrioles nouvellement formés puis le recrutement de protéines dans la matrice péricentriolaire, constituant l'étape de maturation des centrosomes. En mitose, le pont protéique flexible reliant les deux centrosomes matures est rompu, les centrosomes migrent aux pôles opposés de la cellule et initient la formation du fuseau mitotique. Lors de la cytokinèse, chaque cellule fille nouvellement formée ne possède qu'un seul centrosome et le cycle recommence.

## **Les centrosomes et la régulation de l'entrée en mitose**

L'entrée en mitose est principalement régulée par le statut d'activation du complexe Cdk1-CyclineB. Certaines études montrent que pendant la phase G<sub>2</sub>, une sous population de la CyclineB s'accumule sur les centrosomes pour atteindre un maxima fin G<sub>2</sub>-début M [317]. Plusieurs autres régulateurs du complexe Cdk1-CyclineB dont les phosphatases Cdc25B et C, les kinases Plk1, AuroraA et Wee1 localisent également aux centrosomes à la transition G<sub>2</sub>/M et y modulent l'activité kinase du complexe Cdk1-CyclineB [141, 142, 148-155, 164-166]. Toutes ces données suggèrent que les centrosomes servent de sites d'initiation de l'entrée en mitose [138].

Plusieurs publications récentes ont montré que la kinase CHK1 de la réponse aux dommages à l'ADN régule aussi l'activité du complexe Cdk1-CyclineB aux centrosomes. En effet, ces travaux montrent qu'en présence ou en absence de dommages à l'ADN, CHK1 régule négativement l'activation Cdc25B-dépendante du complexe Cdk1-CyclineB aux centrosomes et prévient ainsi l'initiation prématurée de la mitose [86, 87, 318-320]. Il est également à noter que plusieurs autres protéines de la réponse aux dommages à l'ADN telles que p53, BRCA1, ATM, ATR, l'histone  $\gamma$ H2AX ainsi que CHK2 ont été détectées aux centrosomes dans des expériences d'IF, suggérant que les protéines de la RDA sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire aux centrosomes ou inversement, que les centrosomes jouent un rôle dans la RDA [2, 264, 265, 321-328].

Ainsi, une accumulation d'évidences semble positionner le centrosome comme centre d'intégration des signaux régulant l'entrée en mitose et la réponse aux dommages à l'ADN [87, 148, 150, 306, 329-333]

## **Les centrosomes et le cancer**

Un nombre anormalement élevé de centrosomes est une caractéristique commune à la plupart des cancers humains et corrèle avec l'agressivité tumorale [334, 335]. La présence de centrosomes surnuméraires peut conduire à des mitoses multipolaires et entraver la ségrégation équitable des chromosomes en mitose. L'amplification du nombre de centrosomes représente donc une cause d'aneuploïdie et une force motrice de la progression tumorale [336]. Alors que les mitoses multipolaires conduisent généralement à



la catastrophe mitotique, la plupart des cellules cancéreuses qui ont des centrosomes surnuméraires évitent la catastrophe mitotique en regroupant leurs centrosomes sur deux pôles permettant l'exécution de mitoses bipolaires. Les mécanismes moléculaires soutenant ce mécanisme d'adaptation demeurent à ce jour obscurs, mais représentent des cibles potentiellement intéressantes en thérapeutiques antitumorales [337-340].

### **Signalisation croisée entre la réponse aux dommages à l'ADN et la mitose**

Des investigations récentes ont démontré que plusieurs protéines de la RDA participent aussi à la régulation de la mitose et son point de contrôle (SAC). Par exemple, comme je l'ai déjà mentionné plus haut, il a été montré que la kinase CHK1 régule négativement l'entrée en mitose en inhibant l'activation du complexe Cdk1-CyclineB aux centrosomes [86, 87, 318-320]. CHK1 a également été impliqué dans la régulation de la progression mitotique et dans la cytokinèse [341-343]. Bien que le rôle de CHK1 dans l'inhibition du complexe Cdk1-CyclineB aux centrosomes soit un paradigme accepté depuis quelques années, une étude très récente a montré que l'inhibition de Cdk1 par CHK1 se produit dans le noyau et non aux centrosomes [344-349]. De plus, d'autres travaux suggèrent que CHK1 participe à la signalisation du SAC en régulant l'activité de la kinase Aurora B et la localisation aux kinétochores de la protéine BubR1 [350, 351]. ATM s'est également vu attribuer des rôles dans la régulation de la mitose et des données récentes montrent qu'elle est activée par AuroraB et participe au SAC en phosphorylant la protéine Bub1 [352, 353]. Des études chez la levure suggèrent également que ATR prend part à la régulation du SAC [354].

Plus récemment, un nouveau rôle pour la kinase CHK2 dans la formation du fuseau mitotique et la progression normale de la mitose a été mis à jour [263]. Cette fonction de CHK2, qui est à priori indépendante de la réponse aux dommages à l'ADN, implique la phosphorylation par CHK2 de BRCA1(S988) et est requise pour le maintien de l'intégrité chromosomique des cellules cancéreuses colorectales HCT116 [263]. La kinase DNA-PK, bien connue pour son rôle dans la réparation des CDBs, est également requise pour la formation du fuseau mitotique et la ségrégation équitable des chromosomes [355]. L'idée d'une signalisation croisée entre les voies régulant la RDA et la mitose est renforcée par

l'observation que plusieurs protéines de la RDA localisent sur des structures typiquement mitotiques. Par exemple, BRCA1 a été détectée sur les centrosomes, 53BP1 aux kinétochores et l'ubiquitine ligase RNF8 aux centrosomes, kinétochores et au mid-body [321, 356-359]. Finalement, pour plusieurs protéines de la réponse précoce aux dommages à l'ADN telles que MDC1, BRCA2 et le complexe BRCA1-BARD1 un nouveau rôle dans le SAC a été démontré [291, 360, 361]. Ces évidences récentes démontrent que plusieurs protéines de la RDA ont également des fonctions dans la régulation de la mitose. À l'inverse, certaines protéines impliquées dans le contrôle du SAC jouent également un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN. Par exemple, la protéine Mps1, nécessaire à l'assemblage du fuseau mitotique et l'attachement des chromosomes aux microtubules, peut contribuer, en réponse à des lésions de l'ADN, à l'arrêt du cycle en G<sub>2</sub>/M via la phosphorylation de CHK2 sur la T68 [362, 363]. La protéine Bub1, une des composantes principales du SAC, semble également être requise pour une réparation efficace de l'ADN en réponse aux radiations ionisantes. Aussi, il a été montré que l'inhibition ATM-dépendante d'AuroraB contribue à l'arrêt du cycle en G<sub>2</sub>/M en réponse aux lésions génotoxiques [364, 365]. Ces interactions entre les voies propres à la réponse aux dommages à l'ADN et celles qui contrôlent la mitose et le SAC supportent le paradigme émergent de l'existence d'un jeu d'influence à double sens entre les voies de la RDA et la machinerie mitotique.

### **La réponse des cellules aux dommages à l'ADN en mitose**

Dans les cellules en interphase, la réponse aux dommages à l'ADN stoppe la progression du cycle cellulaire aux points de contrôle G1/S, intra-S ou G2/M, empêchant ainsi les cellules d'initier la mitose en présence de lésions génotoxiques. Par contre, la façon dont les cellules gèrent les dommages à l'ADN lorsqu'ils surviennent *après* que les cellules soient commises en mitose demeure méconnue. La présence chez les cellules eucaryotes d'une forme de point de contrôle sensible aux dommages à l'ADN en mitose demeure une question sans réponse [366].

La réponse des cellules mitotiques à des CDBs a été très peu étudiée jusqu'à présent, mais semble dépendre de plusieurs facteurs tels que la lignée cellulaire étudiée, le moment

pendant la mitose où surviennent les dommages et aussi l'intensité et la nature des dommages [366]. Jusqu'à présent, cinq comportements cellulaires principaux ont été observés dans des cellules mitotiques porteuses de lésions de l'ADN (Figure 17). 1) En présence de CDBs, les cellules complètent leur mitose et arrêtent la progression du cycle qu'une fois de retour dans la phase G1 suivante. Évidemment, dans le cas de dommages très sévères, les cellules meurent par catastrophe mitotique. 2) En réponse à des CDBs l'assemblage du fuseau mitotique aux centrosomes est inhibé et les cellules sont bloquées en prométaphase. L'abrogation de la formation du fuseau mitotique à partir des centrosomes implique la phosphorylation ATM/ATR-dépendante de la protéine Cep63, qui est dès lors déplacée du centrosome [367, 368]. 3) La protéine Plk1 joue plusieurs rôles d'importance dans la mitose incluant l'entrée en mitose, la formation du fuseau mitotique, la transition métaphase-anaphase et la cytokinèse. Des expériences ont montré que Plk1 peut être inhibé de façon ATM/ATR-dépendante en réponse à des CDBs en mitose. Ainsi, l'inhibition de Plk1 constitue un mécanisme potentiel d'arrêt en plusieurs points de la mitose [369-371]. 4) Certaines cellules en mitose répondent aux CDBs par un délai de leur transition métaphase-anaphase. Ce ralentissement semble être ATM/ATR-indépendant et est fortement suspecté d'être la conséquence de dommages dans la région centromérique compromettant la structure et la fonction des kinétochores. Le délai serait dans ce cas plutôt le résultat d'un SAC activé que d'une réponse aux dommages à l'ADN en mitose proprement dite [372]. 5) Pour terminer, des études menées sur des embryons de drosophile ont montré que l'entrée en mitose en présence de dommages à l'ADN conduit au démantèlement des centrosomes en association avec les noyaux qui présentent des lésions. Ces noyaux endommagés sont incapables de se diviser et ne sont pas incorporés dans les cellules de la larve en développement. Ces observations suggèrent que CHK2 prend part à l'inactivation des centrosomes en réponse aux dommages à l'ADN puisque les noyaux CHK2-déficients, qui ne répondent plus aux CDB, sont incorporés dans l'organisme en développement [264, 266, 373].



**Figure 17 : Réponses cellulaires aux dommages à l'ADN en mitose.**

En réponse aux dommages à l'ADN et plus particulièrement aux cassures double-brin (CDBs) en mitose, les cellules adoptent différents comportements selon la nature des dommages ainsi que le moment où les dommages surviennent. Alors que certains modèles cellulaires ne vont montrer qu'un ralentissement dans la progression en mitose (2 et 3), d'autres vont se trouver bloqués en mitose (4) ou encore mourir des suites d'une catastrophe mitotique (1 et 5).

## **Problématiques et objectifs**

La kinase CHK2 est connue surtout pour ses fonctions dans la réponse cellulaire aux stress génotoxiques, mais plus récemment un nouveau rôle pour CHK2 dans la mitose a été mis en évidence [263]. CHK2 est une protéine majoritairement nucléaire dans les cellules somatiques en interphase, mais des données récentes montrent qu'une sous-population de CHK2 est localisée sur les centrosomes. Dans les cellules souches embryonnaires (ES) de souris, CHK2 a une localisation exclusivement centrosomale [265]. Par ailleurs, des études chez la drosophile ont clairement montré la localisation centrosomale de CHK2 dans le syncytium embryonnaire où CHK2 semble permettre l'inactivation et le détachement des centrosomes associés aux noyaux ayant subi des dommages à l'ADN ou des stress réplicatifs. Cette réponse bloque la division mitotique des noyaux endommagés et empêche l'incorporation des noyaux endommagés dans la larve en développement contribuant ainsi à la stabilité génomique de l'embryon [264, 266]. En surexprimant la protéine de fusion HA-CHK2 dans des lignées cellulaires cancéreuses, l'équipe de Tsvetkov a aussi démontré, par immunofluorescence (IF) indirecte, qu'une sous-population de CHK2 localise sur les centrosomes des cellules [2]. La forme phosphorylée de CHK2 sur les résidus T383/T387 a également été localisée aux centrosomes en réponse à des dommages à l'ADN par Kramer et son groupe [86]. Golan et al. ont ensuite, par IF et par une technique de purification des centrosomes, montré la présence de CHK2 aux centrosomes tout au long du cycle cellulaire [267]. Plusieurs lignes d'évidences suggèrent qu'une sous-population de CHK2 est localisée aux centrosomes, cependant, l'absence de contrôles rigoureux de la spécificité des anticorps utilisés dans les expériences d'IF laisse planer un doute quant au caractère réel de ces observations.

*Le premier objectif* de mon travail de maîtrise a été de déterminer la localisation subcellulaire de CHK2 et clarifier si oui ou non une sous-population de CHK2 a effectivement une localisation centrosomale dans les cellules et si oui à quel moment. Cette question nous a semblé importante étant donné que le rôle des centrosomes dans la régulation du cycle cellulaire et de la mitose semble de plus en plus s'établir et que deux, il y a une accumulation d'évidences montrant l'existence d'une signalisation croisée entre la réponse aux dommages à l'ADN et la régulation de la mitose. Pour répondre à cette

question, j'ai testé la spécificité des anticorps anti-CHK2 disponibles sur le marché et développé plusieurs lignées cellulaires soit CHK2-déficientes ou qui surexpriment les protéines de fusion GFP-CHK2 et Flag-CHK2. À l'aide de ces outils nous avons démontré que CHK2 localise aux centrosomes uniquement dans les cellules en mitose et non dans les cellules en interphase. La localisation centrosomale de CHK2 que nous avons mise en évidence dans les cellules en mitose est tout à fait en accord avec les travaux publiés en 2010 dans la revue Nature Cell Biology, qui ont démontré un rôle de CHK2 dans l'établissement correct du fuseau mitotique et, par conséquent, la progression des cellules en mitose [263].

*Le deuxième objectif* de ma recherche a donc été d'élucider la ou les fonctions potentielles de CHK2 dans la mitose et aussi, de façon plus spécifique, la ou les fonctions mitotiques de la sous-population centrosomale de CHK2.

## ARTICLE

# **CHK2 localizes at the centrosomes during mitosis but not in interphase cells.**

Guillaume Chouinard<sup>1</sup>, Isabelle Clément<sup>1</sup>, Julie Lafontaine<sup>1</sup> Francis Rodier<sup>1,3</sup> and Estelle Schmitt<sup>1,2</sup>

### Affiliations

<sup>1</sup>Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Hôpital Notre-Dame et Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

<sup>2</sup>Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>3</sup>Département de radiologie, radio-oncologie et médecine nucléaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

## **ABSTRACT**

Centrosomes function primarily as microtubule-organizing centres and play a crucial role during mitosis by organizing the bipolar spindle. In addition to this function, centrosomes act as reaction centers where numerous key regulators meet to control cell cycle progression. One of these factors involved in genome stability, the checkpoint kinase CHK2, was shown to localize at centrosomes throughout the cell cycle. Here, we show that CHK2 only localizes at the centrosomes during mitosis. Using wild-type and CHK2<sup>-/-</sup> HCT116 human colon cancer cells and human osteosarcoma U2OS cells depleted for CHK2 with small hairpin RNAs we show that several CHK2 antibodies are non-specific and cross-react with an unknown centrosomal protein(s) by immunofluorescence. To characterize the localization of CHK2, we generated cells expressing inducible GFP-CHK2 and Flag-CHK2 fusion proteins. We show that CHK2 localizes to the nucleus in interphase cells but that a fraction of CHK2 associates with the centrosomes in mitotic cells, from early mitotic stages until cytokinesis. In contrast with previous reports our findings do not support a role for CHK2 in the bipolar spindle formation and the timely progression of mitosis in human osteosarcoma U2OS cells.

Key words : CHK2, centrosomes, mitosis, cell cycle.



## INTRODUCTION

The serine/threonine checkpoint kinases CHK1 and CHK2 are core components of the cell response to genotoxic stresses<sup>1,2</sup>. In response to DNA damage, CHK1 and CHK2 are activated by Rad3-related (ATR) and ataxia-telangiectasia mutated (ATM) protein kinases respectively, targeting many downstream substrates that coordinate cell cycle checkpoint activation, DNA repair and apoptosis<sup>3,4</sup>. Interestingly, recent studies have highlighted roles for CHK1 and CHK2 during normal cell cycle regulation in the absence of DNA damage. CHK1 has been reported to play a role in unperturbed S phase and in delaying the entry of cells into mitosis<sup>5-9</sup>. CHK1 has also been shown to be required for mitosis progression and for spindle assembly checkpoint function<sup>10-13</sup>. Recently, a role for CHK2 in the assembly of the bipolar mitotic spindle and normal mitosis progression has been reported<sup>14</sup>. This DNA-damage-independent function of CHK2 is mediated by the phosphorylation of the tumor suppressor BRCA1 on Ser 988, and is required to maintain chromosomal stability in the HCT116 human colorectal tumor cell line<sup>14</sup>.

Centrosomes function primarily as microtubule-organizing centres and play a crucial role in the formation of bipolar spindles and chromosomal segregation during mitosis<sup>15,16</sup>. In addition, increasing evidence suggests that centrosomes also play roles in regulating various cell signalling pathways including cell cycle regulation and the DNA damage response<sup>16-18</sup>. Numerous cell cycle regulatory molecules have been identified at the centrosomes which are thought to function as integration sites of positive and negative pathways to regulate cell cycle progression<sup>16,17,19-25</sup>. A growing number of components of the DNA damage response network, including p53, ATM, ATR, CHK1, CHK2, Rad 51 and BRCA1 and 2 have also been localized at the centrosomes supporting a role for centrosomes in the DNA damage response<sup>7, 8, 26-37</sup>. At the G2/M boundary, the molecular

events that initiate entry into mitosis occur at the centrosomes where the activation of the mitotic kinase CDK1-cyclinB is initiated<sup>38-41</sup>. Several studies report that a subpopulation of CHK1 localizes to the interphase centrosomes where its function is to prevent the premature initiation of mitosis by inhibiting centrosome-associated CDK1-CyclinB activation during normal cell cycle progression<sup>7-9</sup>. Recently, this model was called into question by Inagaki's group. They reported that the mouse monoclonal antibody used to reveal endogenous CHK1 at centrosomes cross-reacts with the centrosomal protein Ccdc151 (Coiled coil domain containing 151). This suggests that CHK1 does not localize to the centrosomes and that the timing of mitotic entry is regulated by the nuclear pool of CHK1<sup>42, 43</sup>.

Although CHK2 is mainly nuclear in somatic cells, several reports document the presence of a subpopulation of CHK2 at centrosomes. Strikingly, in embryonic stem (ES) cells, CHK2 has been shown to localize exclusively at the centrosomes and studies performed in *Drosophila melanogaster* embryos suggest that DmCHK2 localizes at the centrosomes to inhibit spindle assembly and mitosis in response to DNA damage<sup>30,32,44</sup>. Using antibodies against CHK2-phospho-Thr68 in immunofluorescence experiments (IF), Tsvetkov and colleagues reported that a subpopulation of CHK2 localizes at centrosomes in interphase and mitotic cells in the absence of induced DNA damage<sup>31</sup>. In the same study, a centrosomal localization for a subset of HA-tagged CHK2 protein under specific IF conditions with pre-extraction of cells with 0.1% Triton X-100 was reported<sup>31</sup>. The Thr 383/387-phosphorylated form of CHK2 has also been localized at centrosomes in response to DNA damage, and CHK2 was found to co-purify with centrosomes in gradient-purified centrosome preparations<sup>7,45</sup>. Despite these observations, the centrosomal localization of CHK2 remains controversial and there are doubts regarding the specificity of the antibodies used to demonstrate expression of CHK2 at the centrosomes by

immunofluorescence. In the present study we show that anti-CHK2 antibodies used to stain CHK2 at centrosomes cross-react non-specifically with an unknown centrosomal protein (s). By using cells lines expressing Flag or GFP-tagged CHK2 proteins, we demonstrate that CHK2 localizes exclusively in the nucleus of cells in interphase. However, we observed that a small portion of CHK2 localizes to centrosomes in mitotic cells, from late prophase until cytokinesis supporting a role for CHK2 during mitosis <sup>14</sup>.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **CHK2 is localized in the nucleus but not at the centrosomes in interphase cells**

Several antibodies raised against CHK2 have been reported to stain the centrosomes by immunofluorescence in HEK293T and U2OS cells<sup>7,31</sup>. We confirm that both the rabbit polyclonal affinity-purified antibodies raised against the N-terminal amino acids 1 to 300 of CHK2 (H-300) as well as the CHK2-phospho-Thr68 antibody stain the centrosomes of U2OS cells fixed with 100% methanol. To validate the specificity of these antibodies in immunofluorescence experiments, we used an isogenic human colorectal As expected, the 62 kDa band corresponding to the CHK2 protein was not detected cancer HCT116 cell line with a targeted deletion of CHK2<sup>46</sup>. The expected 62 kDa band corresponding to the molecular weight of CHK2 protein was not detected in the HCT116 CHK2<sup>-/-</sup> cells by Western blotting, but was detected in the wild type (WT) cells (Fig. 1A). Although we obtained positive staining at the centrosomes with the CHK2 H-300 and phospho-Thr68 antibodies in IF experiments there was no significant difference in the staining at the centrosomes between the HCT116 WT and CHK2 knockout cells (Fig. 1B). The HCT116

CHK2<sup>-/-</sup> cells were generated by deleting a 160 bp genomic sequence located within the kinase domain of CHK2 through homologous recombination and as expected we did not detect full-length CHK2 protein (Fig 1A) [250]. However, we cannot exclude the possibility that an N-terminal catalytically inactive protein may be synthesized and localizes at the centrosomes. Therefore, to confirm the results obtained with the HCT116 cell lines, we generated human osteosarcoma (U2OS) cell lines stably transduced with small hairpin *CHK2* RNAs targeting different regions of *CHK2* ORF. Lentiviral shRNAs directed against N-terminal sequences of the *CHK2* ORF located either at 3' (shRNA-1) or 5' (shRNA-2) of Thr 68 were used to infect U2OS cells. U2OS cells lines transduced with a *CHK2* shRNA targeting the 3'UTR sequence (shRNA-3) or with a combination of shRNA 2+3 were also generated. We confirmed the genetic deletion of *CHK2* in the stably transduced cells by immunoblotting, and noted that the efficiency of *CHK2* depletion varied between the cell lines (Fig. 2A). Next, we developed a methodology that was to allow us to quantify the fluorescence intensity signal specifically at the centrosomes. To do so, we generated a stable U2OS cell population expressing a doxycycline-inducible GFP protein fused to the PACT (pericentrin-AKAP450-centrosome targeting) domain of AKAP450<sup>47</sup>. Confirming previous reports we found that the GFP-PACT fusion protein localized predominantly at the centrosomes (Fig. 2F). We induced the expression of the GFP-PACT fusion protein by adding increasing doses of doxycycline to the culture media. We observed a dose-dependent increase in the expression of the GFP-PACT fusion protein that was proportional to the intensity of the fluorescence measured at the centrosomes thus allowing us to measure fluorescence signals precisely and specifically on centrosome with a high degree of reliability (Fig. 2G and H). We then stained the cell lines generated with the anti-CHK2 H-300 and phospho-Thr68 antibodies. Although the intensity of staining with the H-300 antibody in the U2OS cell lines depleted for *CHK2* decreased in the nucleus, the

centrosomes remained positively stained in all cell lines. There was no significant decrease of the centrosomal signal in CHK2-depleted cells lines compared to the untransduced U2OS cells or cells transduced with control GFP-shRNAs (Fig. 2B-E). In summary, the staining pattern we obtained with the U2OS cell lines is in agreement with that observed in the HCT116 cells. We confirm the CHK2 H-300 and CHK2-phospho-Thr68 antibodies bind non-specifically to protein(s) other than CHK2 localized at the centrosomes in interphase cells.

### **CHK2 localizes at the centrosomes in mitotic cells**

To examine more closely the localization of CHK2, we generated stable U2OS cell lines that express the fusion protein GFP-CHK2 or Flag-CHK2 under the control of the doxycyclin-inducible promoter (Fig. 3A). We first assessed the functionality of the GFP and Flag-tagged CHK2 proteins by examining their phosphorylation status in response to DNA damage induced by ionizing radiation ( $\gamma$ -IR). In response to gamma rays, the exogenous CHK2 fusion proteins were found phosphorylated on Thr 68, Thr 383/387 and Ser 516, the principal sites phosphorylated within the activated protein, suggesting that the kinases are fully active (Supplementary, Fig. 1A). In addition, we detected increases in the phosphorylation of the CHK2 substrate CDC25 A (Ser 123) indicative of GFP- and Flag-CHK2 activation in the transduced cell lines relative to U2OS control cells (supplementary Fig. 1B). These data suggest that the doxycycline-inducible GFP-CHK2 and Flag-CHK2 proteins are functional kinases<sup>1, 48</sup>.

In direct immunofluorescence experiments performed 48 h following doxycycline addition to the culture medium, we found GFP-CHK2 to be exclusively localized in the nucleus of interphase cells with no apparent centrosomal staining (Fig. 3B). However, we detected GFP-CHK2 at the centrosomes in mitotic cells. We found a small subpopulation of GFP-

CHK2 at the centrosomes from the late prophase/early prometaphase stage, where centrosomes separate and migrate to cell poles, until cytokinesis. We also observed GFP-CHK2 concentrated at the mid-body in late mitosis (Fig. 3B). We obtained similar results in immunostained cells expressing Flag-CHK2 fusion protein by indirect immunofluorescence microscopy (Fig 3C). The centrosomal localization of GFP-CHK2 and Flag-CHK2 in mitotic cells was maintained when microtubules were depolymerised by nocodazole treatment, suggesting that CHK2 localizes to mitotic centrosomes in a microtubule-independent manner (Supplementary Fig. 2). To further confirm the reliability of these results, we also generated U2OS cell lines transduced with the doxycycline-inducible GFP, GFP-CHK1 and Flag-CHK1 constructs. As expected, and contrary to GFP-CHK2 and Flag-CHK2, the GFP, GFP-CHK1 and Flag-CHK1 proteins, although induced at high levels in the U2OS cell lines, did not localize to the centrosomes in mitotic cells (Supplementary Fig. 3). In interphase cells expressing very high levels of GFP protein, some centrosomes appeared slightly stained but most cells did not stain at the centrosomes (Supplementary Fig. 3B). Although A. Krämer and colleagues demonstrated an association of GFP-CHK1 with centrosomes in interphase cells, this result remains controversial as a recent study published by Inagaki's group showed that endogenous CHK1 as well as Flag- and Myc-tagged CHK1 do not localize at centrosomes<sup>7,43</sup>. In our IF experiments, GFP-CHK1 and Flag-CHK1 constructs are not detected at centrosomes in interphase nor in mitosis, supporting the model whereby CHK1 controls mitotic entry by inhibiting CDK1-CyclinB activity in the nucleus (Supplementary Fig. 3C and D)<sup>42,43</sup>. Although the results obtained with the U2OS cells expressing the GFP, GFP-CHK1 and Flag-CHK1 proteins suggest that the centrosomal localization revealed for GFP-CHK2 and Flag-CHK2 is specific, we supported our findings by performing live-cell microscopy experiments. In living cells, we observed that a fraction of GFP-CHK2 was associated with the centrosomes during

mitosis from early prometaphase until anaphase. In metaphase, GFP-CHK2 also localizes at the bipolar mitotic spindle. In contrast to GFP-CHK2, no specific enrichment of GFP at any particular structure was detected in mitotic cells (Fig. 4 and Supplementary video 1-2). Collectively, our results suggest that a subpopulation of CHK2 localizes at centrosomes specifically in mitotic cells. These data are consistent with the novel function proposed for CHK2 in the mitotic spindle assembly and the progression of mitosis reported recently by others<sup>14</sup>.

### **Polo-like kinase 1 is required for CHK2 localization at centrosomes**

Polo-like kinase 1 (PLK1) is a key mitotic kinase that regulates mitotic entry and mitosis progression. PLK1 localizes to centrosomes and kinetochores in early mitotic stages and at the central spindle and mid-body in anaphase and cytokinesis<sup>49,50</sup>. Since PLK1 localizes at the centrosomes and regulates CDK1-Cyclin B activation, centrosome maturation and separation as well as spindle assembly, we examined whether it is required for the recruitment of CHK2 at mitotic centrosomes. U2OS cells induced for GFP-CHK2 expression were treated for 3 hours with BI2536, an inhibitor of PLK1, or monastrol, an inhibitor of the Eg5 kinesin<sup>51-53</sup>. We found that both treatments inhibit centrosomes separation resulting in the formation of monopolar spindles and the arrest of cells in prometaphase (Fig 5A). In cells treated with monastrol, GFP-CHK2 was present at the unseparated centrosomes of the monopoles while it was not associated with centrosomes in BI2536-treated cells (Fig. 5A). Similar results were obtained by transfecting cells with a siRNA targeting *PLK1*. Inhibition of PLK1 expression prevents GFP-CHK2 association with centrosomes from late prophase/early prometaphase until metaphase (Fig. 5B and C). These results suggest that PLK1 kinase activity is required for CHK2 recruitment at the centrosomes during mitosis.

## **CHK2 function in mitotic cells**

To investigate a possible role for CHK2 during mitosis, we analysed the capacity of cells depleted for CHK2 to progress throughout mitosis following release from a nocodazole block. By monitoring the disappearance of phospho-Histone H3 (Ser10) positive cells, we observed no significant differences in the kinetics of mitotic exit between control untransduced and shGFP-transduced cells and cells transduced with shRNAs targeting CHK2 (Supplementary Fig. 4A). Consistent with this result, the percentage of cells in each phase of mitosis, 45 min upon release from nocodazole block, was similar in the control and CHK2-depleted U2OS cells (Supplementary Fig. 4 B). It has recently been reported that CHK2-dependent phosphorylation of BRCA1 is required for proper spindle assembly in mitosis<sup>14</sup>. Moreover, BRCA1 has been localized at the centrosomes in interphase and mitotic cells where it was reported to inhibit microtubule (MT) nucleation, an event that initiates entry into mitosis<sup>26, 54-58</sup>. On the basis of these data and the centrosomal localization of CHK2 observed during mitosis, we explored whether CHK2 plays a role in regulating MTs nucleation and spindle assembly at the centrosomes in mitotic cells. In microtubule nucleation assays, the absence of CHK2 does not alter the kinetics of microtubule asters formation and after 30 min the bipolar mitotic spindle associated with the centrosomes in CHK2-lacking cells resembled to the controls (Supplementary Fig. 4C). This contrasts previous data demonstrating the requirement of CHK2 and its downstream substrate BRCA1 for the timely progression of mitosis and proper spindle formation in HCT116 cells, as our results do not reveal a role for CHK2 in mitotic spindle assembly and mitosis progression in U2OS cells<sup>14</sup>. To address whether CHK2 plays a role in the response to specific mitosis defects, control U2OS-shGFP cells and CHK2-deficient cells were treated with the EG5/KSP inhibitor monastrol known to induce incorrect chromosome-microtubule attachments and defects in chromosome congression at the



metaphase plate<sup>59, 60</sup>. We show that 1h following release of cells from monastrol, approximately 50% of metaphase cells showed at least one unaligned chromosome irrespective of CHK2 expression (Supplementary Fig. 5A). Although most mitotic cells ( $\approx 70\%$ ) were still in prometaphase 45 min following monastrol wash, 30% of cells progress through mitosis and their distribution in mitotic phases did not appear modulated by the loss of CHK2 expression (Supplementary Fig. 5B). These experiments do not support a role for CHK2 in the response of mitotic U2OS cells to chromosome-microtubule misattachments. As a DNA damage responsive kinase with a demonstrated role in the DNA damage-associated mitotic delay in HCT116 cells, we investigated whether CHK2 regulates mitotic progression in response to DNA damage induced by ionising radiation<sup>61, 62</sup>. We found that exposure of mitotic U2OS cells to various doses of  $\gamma$ -irradiation did not hinder their progression through mitosis (Supplementary Fig. 5C). Moreover, 45 min upon release into the cell cycle, the percentage of cells in each phase of mitosis is similar in all cell lines suggesting that CHK2 does not regulate the timely progression of mitosis in response to DNA damage.

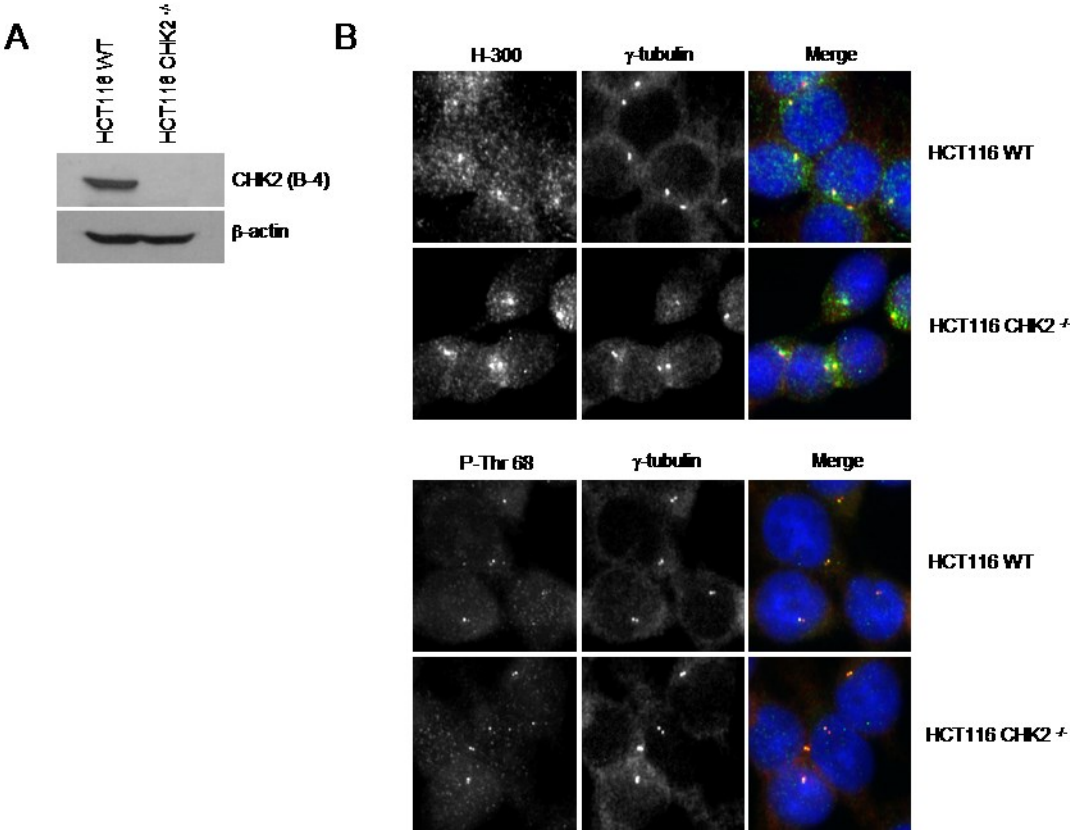
In an attempt to evaluate the centrosomal function of CHK2 in mitotic cells, we established doxycycline-inductible U2OS cell lines expressing GFP-CHK2WT or the mutant kinase dead GFP-CHK2(D347A) fused to the PACT(AKAP450) domain in order to direct expression of the CHK2 proteins at centrosomes<sup>7, 47</sup>. These cell lines were used to analyse the effect of expressing each fusion protein on the kinetics of mitosis progression by monitoring the disappearance of the mitotic marker phospho-Histone H3 (Ser10) after release of cells from a nocodazole block. We observed that the overexpression of the fusion proteins GFP-PACT, GFP-CHK2WT-PACT or GFP-CHK2(D347A)-PACT at the centrosomes dramatically alters the capacity of cells to progress throughout mitosis. This phenotype was independent of CHK2 function at the centrosomes and probably resulted

from the non-physiological overloading of centrosomes (data not shown). Although the fusion of CHK1 with the PACT(AKAP450) domain has been used by others to study its function in the regulation of mitotic entry at the G2/M transition, our results indicate that overexpression of proteins at the centrosomes interfere with centrosome function during mitosis<sup>7, 43</sup>.

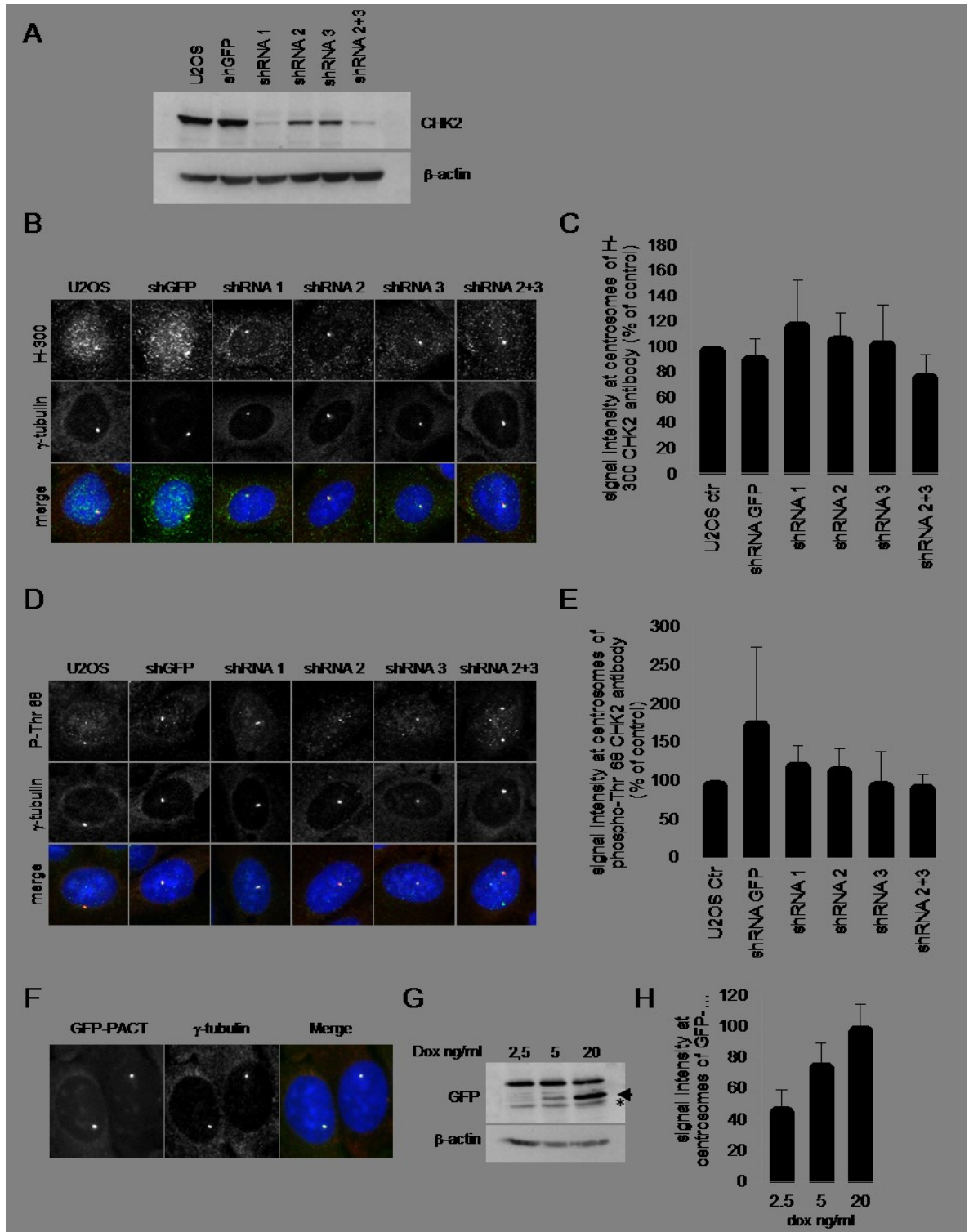
In summary, the present study shows that a sub-population of CHK2 localizes at centrosomes in mitotic cells but not in interphase cells. This centrosomal localization of CHK2 is consistent with recent data published by A. Stolz and co-workers demonstrating a role for CHK2 in proper mitotic spindle formation and timely mitosis progression in human colon carcinoma HCT116 cells. Although our experiments did not reveal a role for CHK2 during mitosis in U2OS cells, this discrepancy can be explained by the use of different cancer cell types to address the mitotic function of CHK2.

# FIGURES

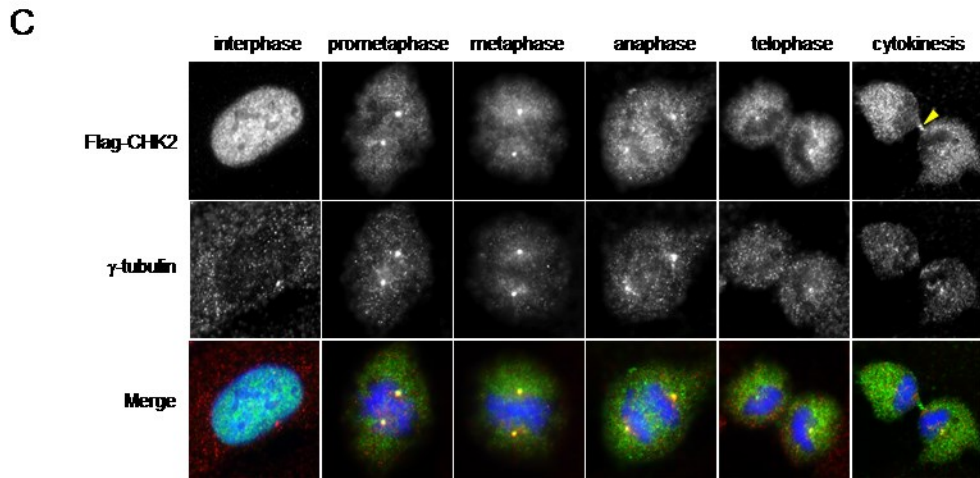
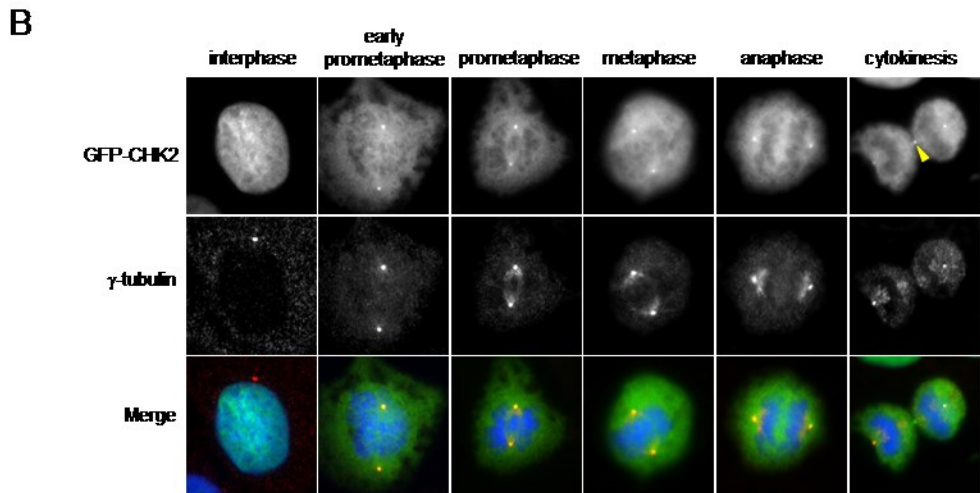
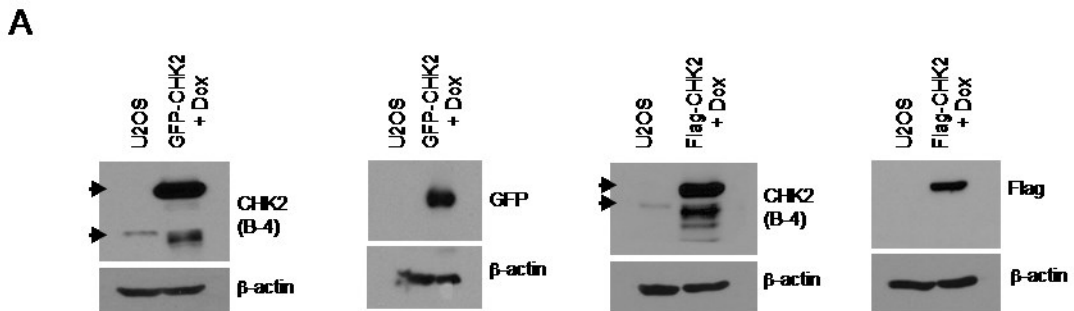
**Figure 1. Centrosomes stain positive for CHK2 in human colon cancer cells deficient in CHK2.**



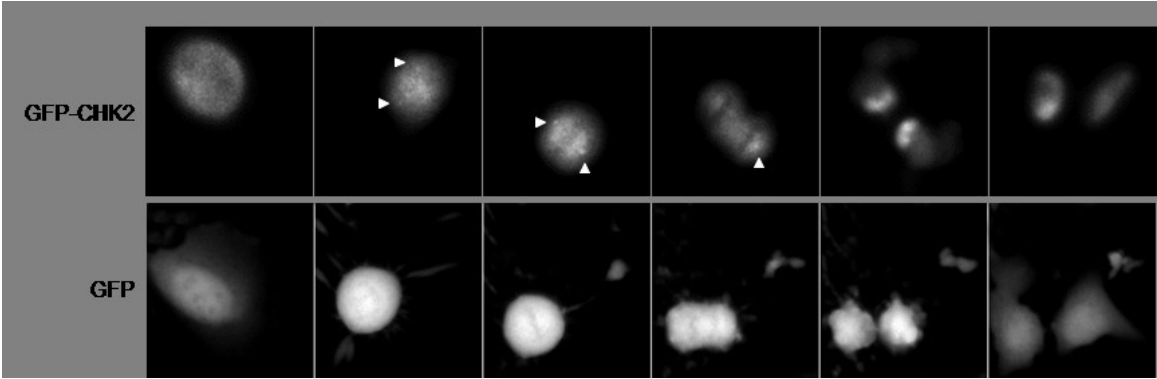
**Figure 2. Centrosomal staining for CHK2 antibodies persists in cells expressing CHK2 targeting shRNAs.**



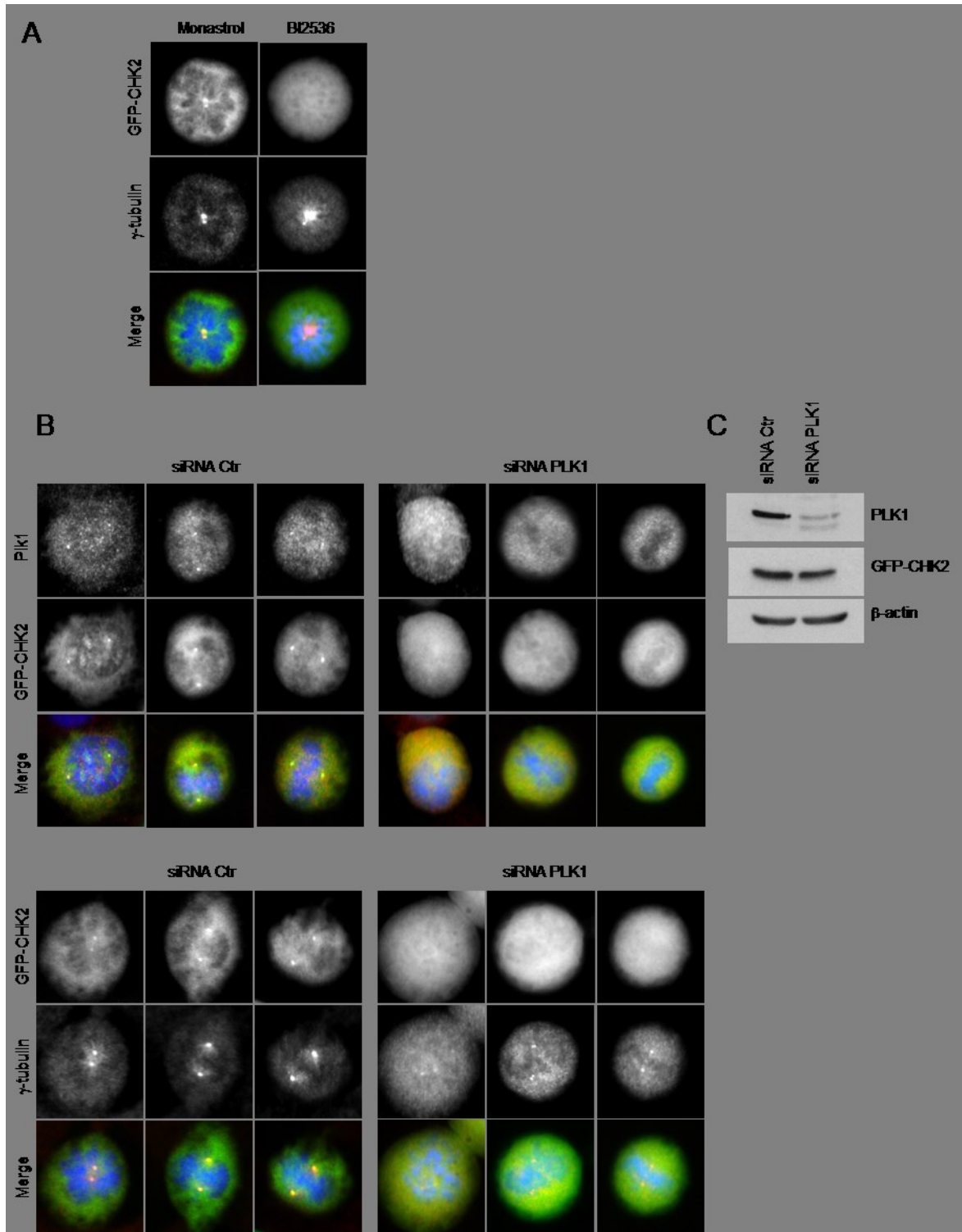
**Figure 3. CHK2 localizes at centrosomes in mitotic cells but not in interphase.**



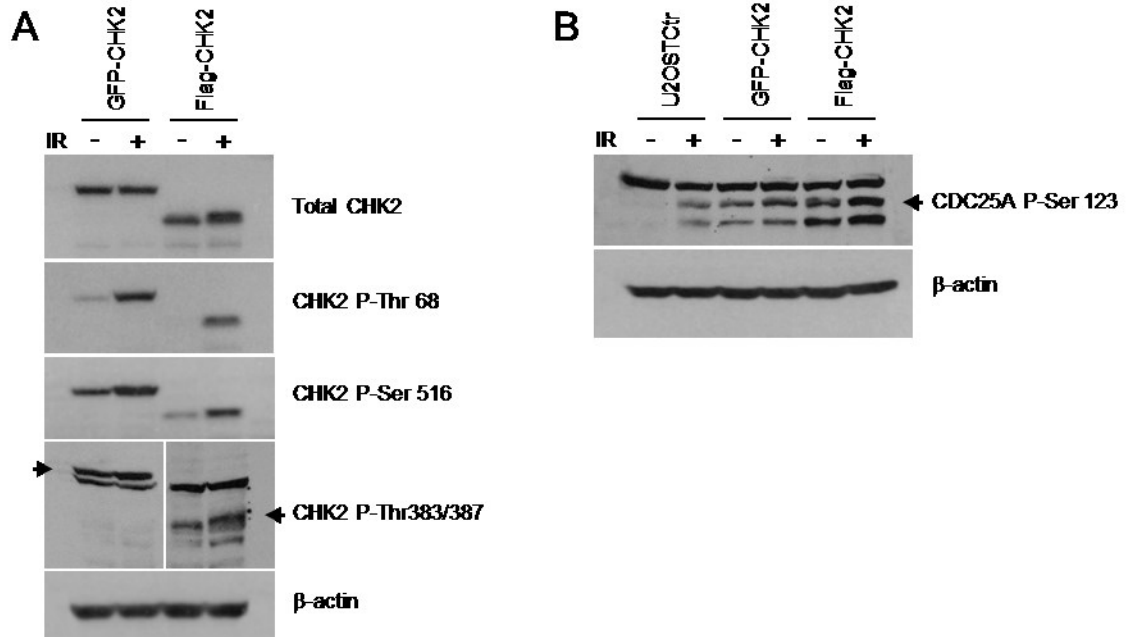
**Figure 4. GFP-CHK2 localizes at centrosomes and spindle in mitotic living cells.**



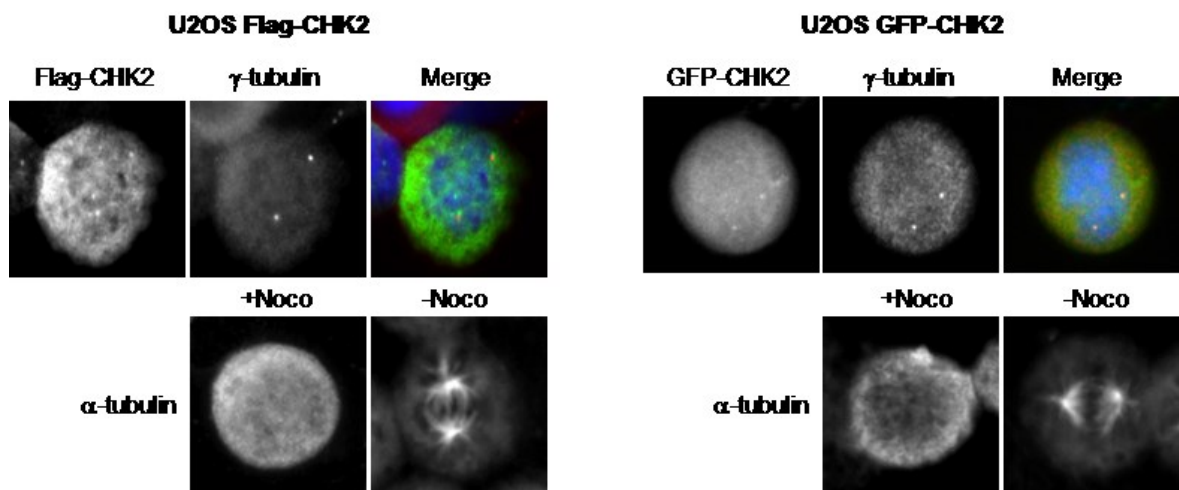
**Figure 5. Polo kinase 1 is required for CHK2 localization at centrosomes.**



**Supplementary Figure 1. The exogenous GFP-CHK2 and Flag-CHK2 fusion proteins are functional kinases.**

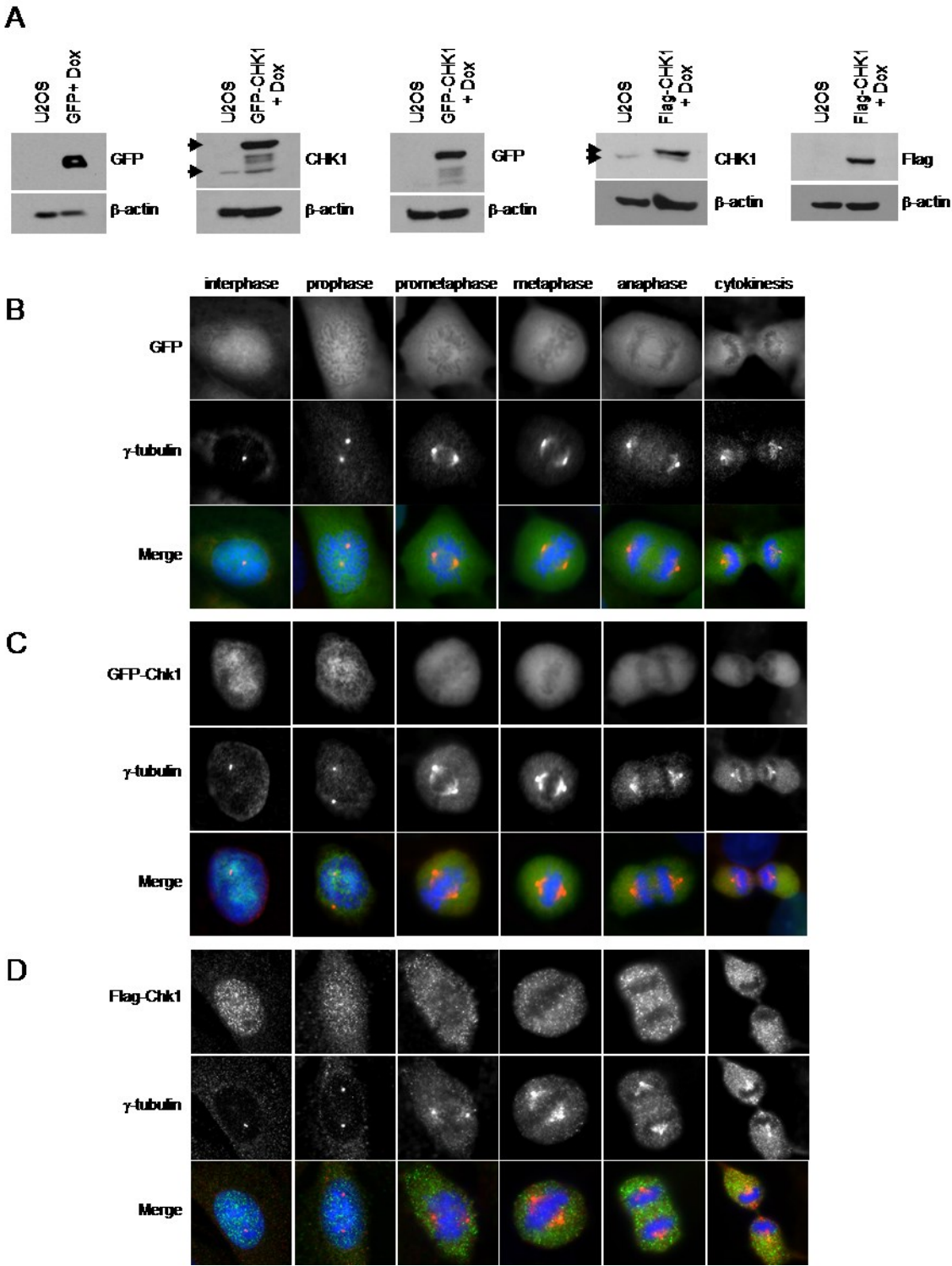


**Supplementary Figure 2. During mitosis the localisation of CHK2 at the centrosomes is microtubules independent.**

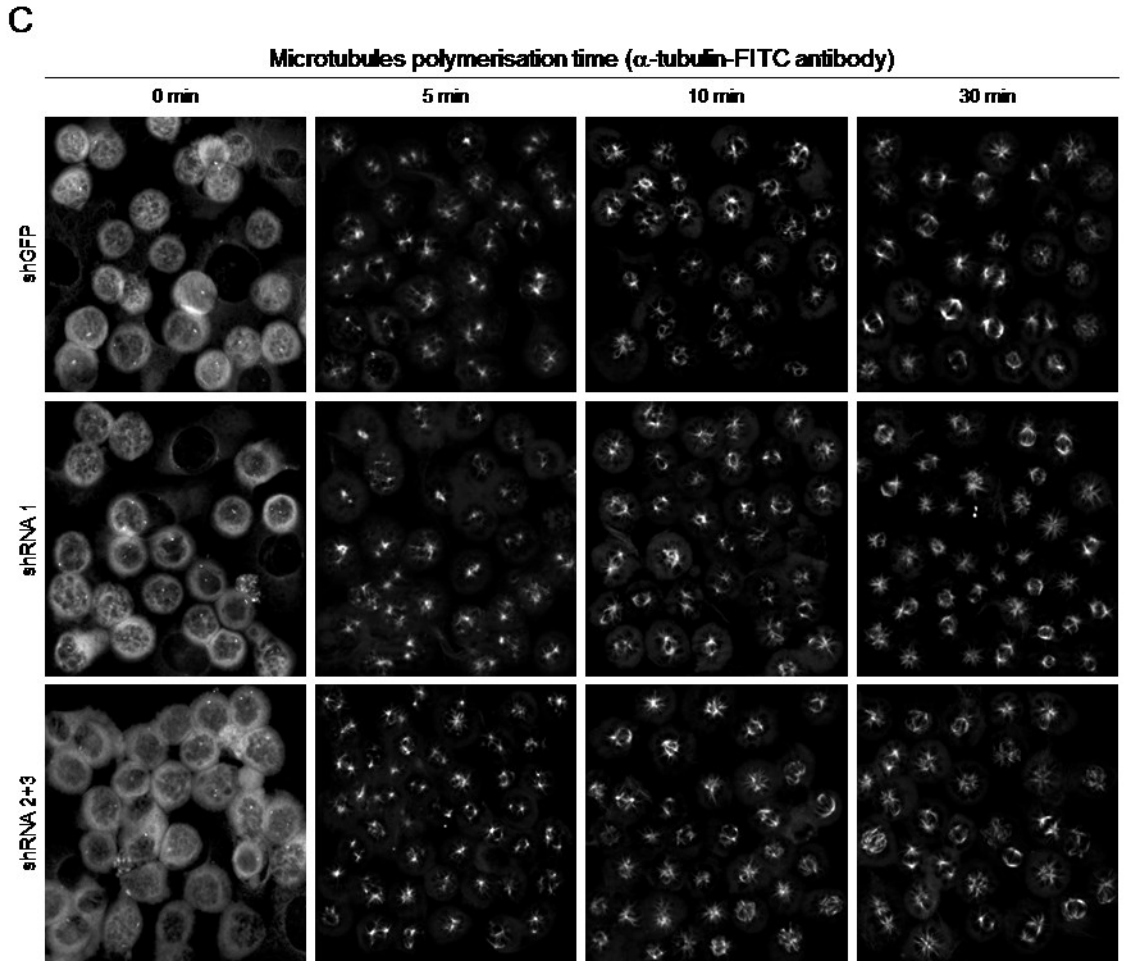
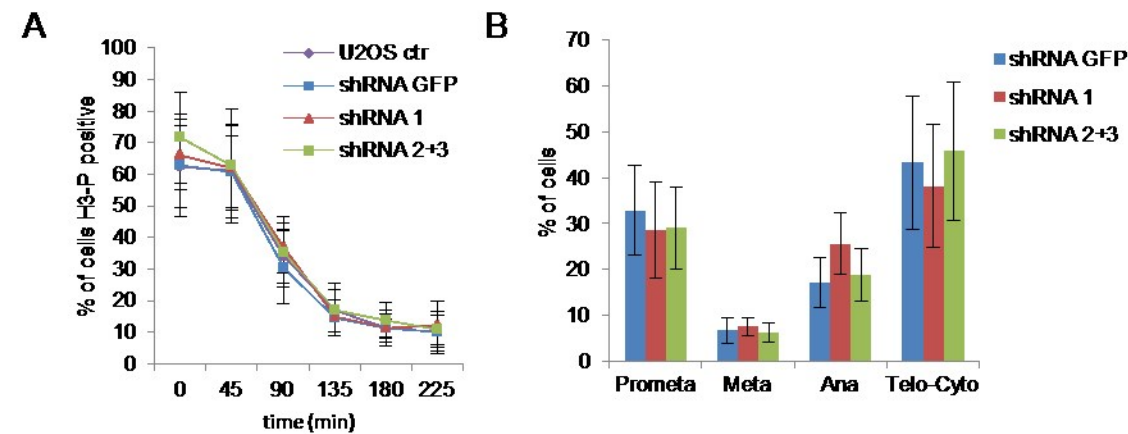




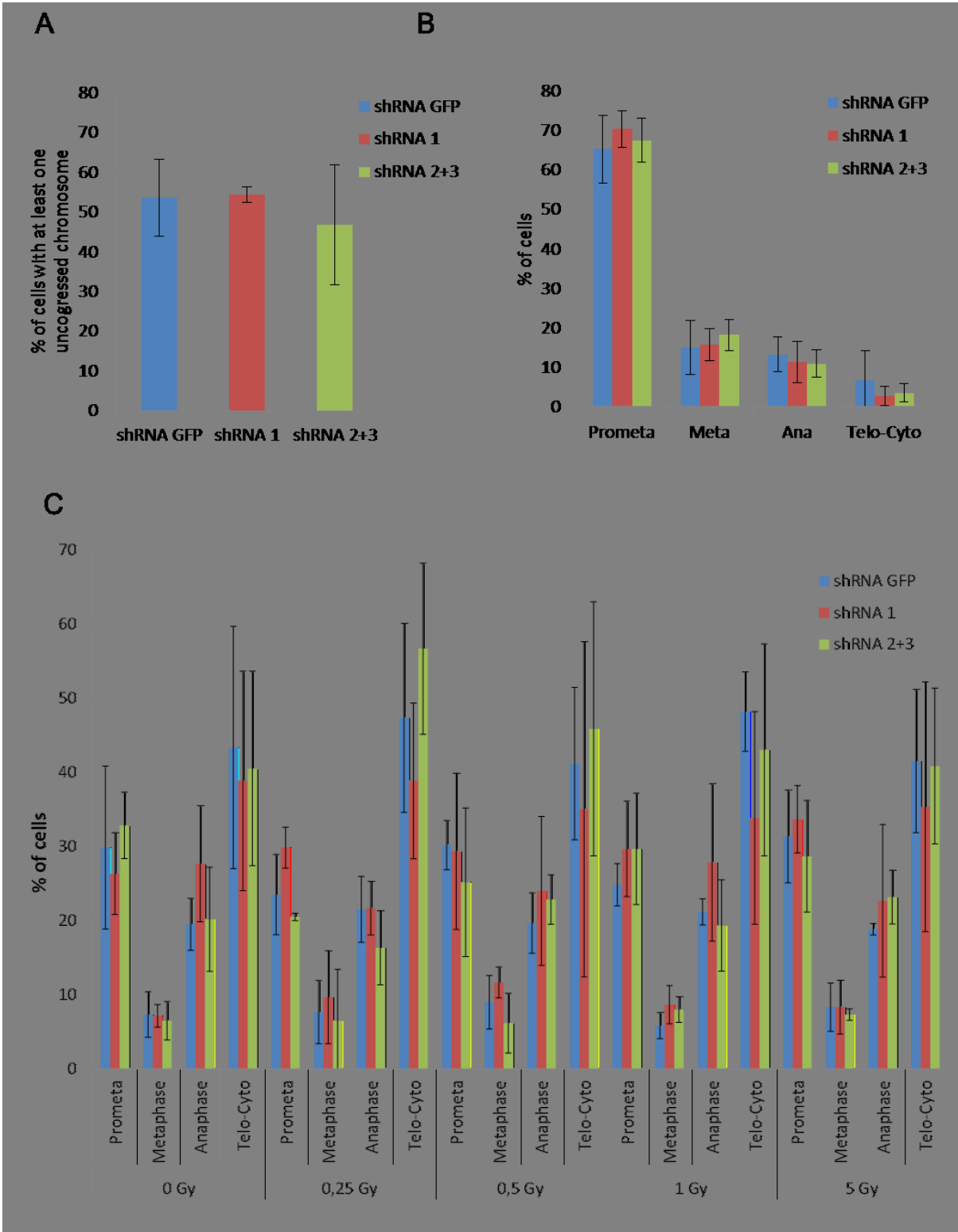
**Supplementary Figure 3. GFP, GFP-CHK1 and Flag-CHK1 do not localize at the centrosomes.**



**Supplementary Figure 4. Depletion of Chk2 does not alter progression of cell through mitosis.**



Supplementary Figure 5.



## LEGENDS

### Figure 1.

**Centrosomes stain positive for CHK2 in human colon cancer cells deficient in CHK2.** (A) There is no expression of CHK2 in HCT116 CHK2<sup>-/-</sup> cells HCT116 WT and HCT116 CHK2 knockout cells were subjected to western blotting with anti-CHK2(B-4) antibody. (B) We did not detect differences in the staining between WT and CHK2 knockout cells. Exponentially growing HCT116 WT and CHK2<sup>-/-</sup> cells were fixed and immunostained with antibodies against the N-terminal portion of CHK2 (H-300) or the Thr68-phosphorylated form (P-Thr 68) (green). Cells were costained for  $\gamma$ -tubulin (red) and counterstained with DAPI (blue).

### Figure 2.

**Centrosomal staining for CHK2 antibodies persists in cells expressing CHK2 targeting shRNAs.** U2OS cells were stably transduced with various shRNAs directed against CHK2 or GFP. (A) Western blots showing the expression level of endogenous CHK2 in the cell lines transduced with the various shRNAs. The expression of CHK2 is decreased to varying degrees with the different shRNAs against CHK2. (B and D) Cells were fixed and immunostained with the indicated anti-CHK2 antibodies (green) and costained for centrosomes (red) and DNA (blue). Representative fields of the immunofluorescence stainings obtained with the indicated cell lines are shown. There is no significant difference in the staining of centrosomes between the WT and the shRNA stable cell lines. (C and E) The fluorescence intensity of the CHK2 antibodies H-300 and P-Thr 68 was quantified and represented as a ratio of the control  $\gamma$ -tubulin signal at centrosomes. This ratio was set at 100% in control untransduced cells. Results are

representative of 3 independent experiments where the intensity at the centrosomes was monitored in 200 cells. Error bars represent the standard deviation from the mean of 3 experiments.

To validate the method of quantification of the fluorescence intensity signal at centrosomes, stable transduced GFP-PACT U2OS cells were generated. (F) A representative field showing the centrosomal localization of the GFP-PACT fusion protein after transgene induction with 20 ng/ml doxycyclin. 48 h after doxycycline addition, cells were fixed and immunostained with anti- $\gamma$ -tubulin antibody (red) and counterstained for DNA (blue). GFP-PACT was visualized by direct fluorescence. (G, H) GFP-PACT expression was induced by adding 2.5, 5 or 20 ng/ml doxycycline to the culture medium and cells were stained as in (F). (G) The expression of GFP-PACT fusion protein at each doxycycline concentration was analysed by immunoblotting protein lysates with anti-GFP antibody. There is a dose-dependent increase in the expression of GFP-PACT induced by doxycycline. The arrow indicates the bands corresponding to GFP-PACT and the asterisk designates non-specific signal. (H) The fluorescence intensity at centrosomes of GFP-PACT was quantified as in C and E and set at 100% in cells induced with 20 ng/ml doxycycline. Graphs represent the mean of intensity  $\pm$  s.d. of 3 independent experiments, each experiment monitoring the intensity at centrosomes in 200 cells.

### **Figure 3.**

#### **CHK2 localizes at centrosomes in mitotic cells but not in interphase**

U2OS cells were transduced with lentiviruses coding for GFP-CHK2 or Flag-CHK2 and stably selected. (A) Cells were exposed for 48h to doxycycline at 5 ng/ml for GFP-CHK2 cells, or 20 ng/ml for Flag-CHK2 cells, and expression of proteins in whole cell extracts was analysed by Western blotting using the indicated antibodies. The arrows indicate

endogenous and exogenous CHK2 proteins. Note that some exogenous CHK2 is expressed without tag.  $\beta$ -actin was used as loading control. (B and C) GFP-CHK2 and Flag-CHK2 are exclusively localized in the nucleus of interphase cells whereas a small subpopulation localizes at the centrosomes during mitosis. 48 h following transgene induction cells were fixed in methanol. Centrosomes were stained with anti- $\gamma$ -tubulin antibody (red), and DNA was counterstained with DAPI (blue). The localization of GFP-CHK2 was observed by direct fluorescence and Flag-CHK2 was immunostained with an anti-Flag antibody (green). Cells in interphase and various phases of mitosis were selected. The yellow arrows are indicating the midbody.

## **Figure 4**

### **GFP-CHK2 localizes at centrosomes and spindle in mitotic living cells**

Representative images of the live cell videos (supplementary video 1- 4) showing mitotic U2OS cells expressing GFP-CHK2 and GFP proteins. Arrowheads indicate centrosomes.

## **Figure 5**

### **Polo-like kinase 1 is required for CHK2 localization at centrosomes**

(A) Inhibition of PLK1 activity with BI2536 inhibits GFP-CHK2 association with centrosomes. U2OS GFP-CHK2 cells were incubated with doxycycline at 5 ng/ml for 32 h and treated for an additional 16 h with BI2536 (100 nM) or monastrol (100 $\mu$ M) in doxycycline-containing medium. Cells were then fixed and stained for centrosomes (red) and DNA (blue) and GFP-CHK2 was visualized by direct fluorescence (green). (B) Inhibition of PLK1 expression prevents GFP-CHK2 association with centrosomes during mitosis. U2OS GFP-CHK2 cells were transfected with a siRNA directed against *PLK1* or control siRNA. 48 h post-transfection cells were fixed to examine GFP-CHK2 localization

by fluorescence microscopy as in (A). (C) Western blot analysis of PLK1 expression shows a significant decrease in the expression of PLK1. Cell lysate from PLK1 siRNA-transfected U2OS cells was prepared from arrested mitotic cells collected by shake-off 48h post-transfection. As a control, U2OS cells transfected with control siRNA were synchronized in mitosis by a 16 hours nocodazole block and protein extracts were prepared from the mitotic cells collected by shake-off.

## **Supplementary Figure 1**

### **The exogenous GFP-CHK2 and Flag-CHK2 fusion proteins are functional kinases**

U2OS GFP-CHK2 and U2OS Flag-CHK2 cell lines were incubated with doxycycline for 48h to induce transgene expression and cells were exposed to  $\gamma$ -IR (10 Gy). (A) 1 h after genotoxic insult whole-cell lysates were prepared and phosphorylation of CHK2 fusion proteins on Thr 68, Thr 383/387 and Ser 516 was assessed by Western blotting using the indicated antibodies. The arrows indicate GFP-CHK2 and Flag-CHK2 proteins phosphorylated on Thr383/387. (B) The phosphorylation of the CHK2 substrate CDC25 A (Ser123) was analysed by Western blotting of protein extracts prepared 8 h after irradiation. The arrow indicates the band corresponding to P-Ser123-CDC25A. Both GFP-CHK2 and Flag-CHK2 retain full kinase activity.

## **Supplementary Figure 2**

### **During mitosis the localisation of CHK2 at the centrosomes is microtubules independent.**

Doxycycline-induced U2OS GFP-CHK2 and U2OS Flag-CHK2 cell lines were incubated for 16 h in nocodazole (0.3  $\mu$ M) to arrest cells in prometaphase. Cells were treated for an additional hour with 10  $\mu$ M nocodazole prior to be fixed and stained with anti- $\gamma$ -tubulin

antibody (red) to stain the centrosomes. GFP-CHK2 was visualized by direct fluorescence and Flag-CHK2 was immunostained with an anti-Flag antibody (green). To control microtubules depolymerisation, cells treated or not with nocodazole were also stained for  $\alpha$ -tubulin.

### **Supplementary Figure 3**

#### **GFP, GFP-CHK1 and Flag-CHK1 do not localize at the centrosomes.**

U2OS stably transduced with lentiviruses coding for GFP, GFP-CHK1 or Flag-CHK1 were exposed to doxycycline at 5 ng/ml, 10 ng/ml and 20 ng/ml. (A) 48h following doxycycline addition cells were collected. The expression of exogenous proteins was analysed by Western blotting using the indicated antibodies. The arrows denote endogenous and exogenous CHK1 proteins.  $\beta$ -actin was used as loading control. (B-D) 48 h post-induction, cells were fixed and immunostained with anti- $\gamma$ -tubulin antibody (red) and costained with DAPI (blue). The localization of GFP and GFP-CHK1 was observed by direct fluorescence and Flag-CHK1 was immunostained with an anti-Flag antibody (green). Cells in interphase and various phases of mitosis were selected.

### **Supplementary Figure 4**

#### **Depletion of Chk2 does not alter progression of cell through mitosis**

(A) The U2OS control and Chk2-deficient cell lines were treated with nocodazole (0.3  $\mu$ M) for 16 h. Following release into the cell cycle, the mitotic index was determined as the percentage of phospho-Histone H3 (Ser10) positive cells by flow cytometry at the indicated time points. Data represent the mean  $\pm$  standard deviation of 7 independent experiments for the untransduced and the CHK2-depleted U2OS cell lines and 4 experiments for the shGFP-U2OS cell line. (B) U2OS cells were arrested in early mitosis by a 16 h nocodazole



(75 nM) block. 45 min after release in drug-free medium, cells were fixed with PFA 3,7% and stained with antibody against  $\alpha$ -tubulin to visualize the spindle, and DAPI for DNA. The percentage of cells in each phase of mitosis was determined. We carried out 6 independent experiments where 200 mitotic cells were analyzed per experiment. Results represents the mean percentage  $\pm$  standard deviation (C) Mitotic-arrested cells were incubated for 1 hour with 10  $\mu$ M nocodazole to completely depolymerise MTs. After release from nocodazole, cells were fixed at the indicated time points and stained against  $\alpha$ -tubulin to monitor MTs regrowth.

## **Supplementary Figure 5**

(A) The U2OS cell lines were treated for 16 h with 100  $\mu$ M monastrol to induced microtubule-kinetochore mis-attachements in mitotic cells. Cells were washed twice and released for 1 h in medium containing MG132 (20  $\mu$ M) prior to fixation and staining as in (B). The percentage of metaphase cells with at least 1 uncongressed chromosome was determined. Data show the mean percentage of 3 independent experiments, each experiment analyzing 200 mitotic cells. Error bars represent s.d. of the mean. (B) 45 min after release from monastrol block into normal medium, the percentage of cells in each phase of mitosis was determined as in Fig. S 4B. (C) Exponentially growing U2OS cell lines were incubated with nocodazole (75 nM) for 16 h and exposed to different doses of  $\gamma$ -IR. 1 h following irradiation cells were released in normal medium for 45 min and fixed and stained as in Fig. S 4B. Graphs show the mean percentage of cells at each mitotic stage  $\pm$  s.d (n=3).

## **Supplementary Movies**

### **Movie S1**

GFP-CHK2 localizes at centrosomes in mitotic U2OS cells. U2OS GFP-CHK2 were incubated with doxycycline for 48 h and synchronized by a single 24 h thymidine block. When the synchronized cell population progressed through late G2 phase and mitosis, images were acquired every 2 minutes with a Zeiss Axio Observer Z1 automated microscope.

### **Movie S2**

U2OS GFP cells were imaged in the same conditions as for movies S2

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cells culture and Reagents.**

Human osteosarcoma U2OS cells used in all experiments stably express the tetracycline (Tet) repressor. U2OS T-REx cells were obtained from Dr. Eric Campeau (University of Massachusetts, USA). HCT116 WT and CHK2<sup>-/-</sup> cells were a gift from Dr. Fred Bunz (Johns Hopkins University, Baltimore, USA) to Dr. Francis Rodier. Cells were maintained at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal calf serum. BI2536 (Axon Medchem) and monastrol (Enzo Life sciences) were used at 100 nM and 100 μM respectively. Nocodazole was purchased from Sigma-Aldrich.

### **Generation of U2OS cell lines.**

To generate inducible U2OS cells lines expressing CHK2 or CHK1 fused to the GFP or FLAG tag, CHK1 and CHK2 cDNAs were cloned into the entry vectors pENTR4-GFP-C3 (Addgene# w393-1) and pENTR4-FLAG (Addgene # w210-2) respectively and the entry vectors were recombined into the inducible destination vector pLenti CMV/TO

Puro (670-1). To generate inducible U2OS cells expressing GFP-PACT fusion protein, the PACT domain (amino acids 3643-3808) of AKAP450 was amplified from the GFP-AKAP450 vector provided by Dr. S. Munro (Cambridge, United Kingdom) with the following primers: forward, 5'-aagcttgccaacattgaagccatcattgcc-3' and reverse, 5'-gaattcttatgcaccttgattcagtcctcaagc-3'. The amplified sequence was cloned into the entry vector pENTR4-GFP-C3 (Addgene # w393-1) that was recombined into the destination vector pLenti CMV/TO Puro (Addgene # 670-1). To generate inducible U2OS cells expressing GFP-CHK2WT and GFP-CHK2D347A fused to the PACT domain, sequences coding for HindIII-HA-KpnI-CHK2WT-EcoRV, and the dominant negative form HindIII-HA-KpnI-CHK2D347A-EcoRV were cloned without a stop codon into the HindIII/EcoRV sites of the pcDNA4/TO (Invitrogen). Subsequently, the PACT domain of AKAP450 was amplified from GFP-AKAP450 vector with the following primers: forward, 5'-gatatcgccaacattgaagccatcattgcc-3' and reverse, 5'-ctcgaggaattcttatgcaccttgattcagtcctcaagcc-3' and cloned at the C-terminus of CHK2WT and CHK2D347A in pcDNA4/TO digested with EcoRV/XhoI. Finally, the inserts HA-CHK2WT-PACT and HA-CHK2(D347A)-PACT were released from pcDNA4/TO by double digestion with HindIII/EcoRI and cloned into the entry vectors pENTR4-GFP-C1 (Addgene # w392-1) that were recombined into the destination vector pLenti CMV/TO Puro (Addgene # 670-1). Lentiviruses for all the constructs were generated with virus titers to infect 50 to 80% of cells and stably transduced cells were selected with 0.5 µg/ml puromycin<sup>63</sup>.

### **RNA interference.**

RNAi lentiviruses previously shown to effectively reduce CHK2 levels were purchased from Open Biosystems<sup>64</sup>. The short hairpin target sequences used were: shRNA-1 # TRCN0000039946: 5'-GCCAATCTTGAATGTGTGAAT-3' ;

shRNA-2 #TRCN0000010213: 5'-ACGATGCCAAACTCCAGCCAG-3' ;

shRNA-3 #TRCN0000010314: 5'-ACTCCGTGGTTTGAACACGAA-3'.

For PLK1 knockdown cells were transfected with a siRNA targeting the sequence 5'-AGAUUGUGCCUAAGUCUCU-3'<sup>65, 66</sup>. Transfection of siRNAs was carried out using DharmaFECT reagent (Thermo Scientific, Dharmacon) according to manufacturer's instructions.

### **Immunofluorescence microscopy.**

Cells were grown on high precision 18 mm/1.5H glass coverslips (Marienfeld) and fixed in -20°C methanol for 15 min and blocked with PBS containing 3% BSA, 2% FCS, 0.3% Triton X-100. Fixed cells were incubated for 1 hour at room temperature with the indicated primary antibodies diluted in blocking buffer, and for 45 min with the Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies. DNA was stained for 5 min with DAPI at 100 ng/ml (Sigma). Images were acquired using a Nikon Eclipse 600 fluorescence microscope equipped with a CoolSNAP HQ<sup>2</sup> camera (Photometrics) and processed using NIS-Element AR 3.0 and Photoshop (CS5, Adobe). Cells were immunostained using the following primary antibodies: anti- $\gamma$ -tubulin (GTU-88, Sigma T6557, 1:2000), anti-CHK2 (H300, Santa Cruz, 1:50), anti-phospho-Thr68-CHK2 (Cell signaling 1:50), anti- $\alpha$ -tubulin (DM1A, Sigma 1:500), anti- $\alpha$ -tubulin-FITC conjugated (DM1A, Sigma 1:500), anti-Flag (M2, Sigma, 1:1000), anti-Flag (F7425, Sigma, 1:250), anti-PLK1 (#06-813, Millipore 1:100) and the secondary antibodies Alexa Fluor 488/TxRed (Molecular Probes, 1:800). For the quantification of fluorescence signal intensities at the centrosomes, unsaturated images were acquired with the same exposure settings. The areas corresponding to the centrosomes were defined with the  $\gamma$ -tubulin stainings and fluorescence intensities within the determined centrosomal areas were measured using NIS-Element software.

## **Western Blotting.**

To prepare protein extracts cells were lysed in lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2.5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF, 5 mM sodium pyrophosphate, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μM MG132, 20 mM β-glycerophosphate, and a cocktail of proteases inhibitors (Complete™ Roche Applied Science). Proteins were run on 10% SDS-PAGE gels, transferred on nitrocellulose membranes and analyzed by immunoblotting. The antibodies used were anti-GFP (ab290, abcam, 1:1000), anti-Flag (M2, Sigma, 1:1000), anti-CHK2 (B-4, Santa Cruz, 1:500), anti-CHK1 (DCS310, SantaCruz 1:500), anti-phospho-Thr68-CHK2 (Cell signalling, 1:1000), anti-phospho-Thr387-CHK2 (Assay bioTech, 1:500), anti-phospho-Ser516-CHK2 (Cell signalling, 1:1000), anti-phospho-Ser123-CDC25A (MJS Biolynx 1:250), anti-phospho-Ser20-p53 (Cell signalling 1:500), anti-PLK1 (#06-813, Millipore, 1:500), anti-β-actin (AC-74, Sigma, 1:20 000).

## **Time-lapse microscopy.**

For live cell videomicroscopy, U2OS cells transduced with GFP-CHK2 or control GFP were grown on special optics 96 well plates 170 μM bottom thickness (Corning). Cells were induced with doxycycline for 48 h and synchronized at the G1/S transition using a single 24 h thymidine block. 8 h after release from thymidine block they were incubated in FCS-supplemented Dulbecco's modified Eagle's Medium without phenol red and placed in a heated chamber with 5% CO<sub>2</sub>. Images were captured with a Zeiss Axio Observer Z1 automated microscope every 2 minutes with a 40x/0.95NA objective and a Zeiss Axiocam HRm.

### **Determination of the kinetics of mitotic exit.**

To determine the mitotic index, nocodazole-synchronized cells were washed twice and released in fresh medium. Cells were fixed in PBS, 70% ethanol, rehydrated in PBS, 1% BSA and permeabilized for 15 min at 4°C with PBS, 1% BSA, 0.25% Triton X-100. After centrifugation cells were washed and resuspended for 2 h at room temperature in PBS, 1% BSA, Alexa Fluor 647-conjugated phospho-Histone H3 (Ser10) antibody (Cell signaling, 1:500). Cells were then washed twice and incubated with PBS containing 0.5 mg/ml RNase A and 50 µg/ml propidium iodide prior to be analyzed by FACS.

### **Microtubule regrowth assay.**

U2OS cells were grown on high precision 18mm 1.5H glass coverslips and treated for 16 h with 0.3 µM nocodazole to accumulate cells in mitotic prometaphase. Cells were then pulsed with 10 µM nocodazole for 1 hour to completely depolymerize microtubules and washed twice with fresh medium to allow microtubules re-growth. Microtubules nucleation was stopped at different time points by methanol fixation and analyzed by immunofluorescence microscopy using an anti- $\alpha$ -tubulin-FITC conjugated antibody (Sigma Clone DM1A, 1:500). To obtain a representative view of MTs regrowth in mitotic cells, for each time point images were acquired at different places on the slide and mitotic cells from different fields were grouped together on one representative image by using Adobe Photoshop software.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Dr S. Munro (Cambridge, United Kingdom) for providing the vector coding for the PACT domain of AKAP450. We are also grateful to Eric Campeau (University of Massachusetts, USA) for the gift of the U2OS TReX cell line and to Fred Bunz (Johns Hopkins University, Baltimore, USA) for the HCT116WT and HCT116CHK2<sup>-/-</sup> cells lines. We thank Drs. Francis Rodier and Richard Bertrand (CRCHUM) for advice and editorial work. This work was supported by the Canadian Institutes of Health research and the Institut du cancer de Montréal. We also thank Mrs Suzana Anjos for her editorial work.

## **ABBREVIATIONS**

IF: immunofluorescence; ORF: open reading frame;  $\gamma$ -IR:  $\gamma$ -irradiation; PLK1: Polo-like kinase 1

## **DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST**

No potential conflicts of interest was disclosed

## **REFERENCES**

1. Bartek J, Falck J, Lukas J. CHK2 kinase-a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:877-86.
2. Antoni L, Sodha N, Collins I, Garrett MD. CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? *Nat Rev Cancer* 2007; 7:925-36.
3. Shiloh Y. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11:71-7.

4. Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* 2010; 108:73-112.
5. Maya-Mendoza A, Petermann E, Gillespie DA, Caldecott KW, Jackson DA. Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. *EMBO J* 2007; 26:2719-31.
6. Petermann E, Woodcock M, Helleday T. Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:16090-5.
7. Kramer A, Mailand N, Lukas C, Syljuasen RG, Wilkinson CJ, Nigg EA, et al. Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat Cell Biol* 2004; 6:884-91.
8. Tibelius A, Marhold J, Zentgraf H, Heilig CE, Neitzel H, Ducommun B, et al. Microcephalin and pericentrin regulate mitotic entry via centrosome-associated Chk1. *J Cell Biol* 2009; 185:1149-57.
9. Gruber R, Zhou Z, Sukchev M, Joerss T, Frappart PO, Wang ZQ. MCPH1 regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1-Cdc25 pathway. *Nat Cell Biol* 2011; 13:1325-34.
10. Tang J, Erikson RL, Liu X. Checkpoint kinase 1 (Chk1) is required for mitotic progression through negative regulation of polo-like kinase 1 (Plk1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:11964-9.
11. Peddibhotla S, Lam MH, Gonzalez-Rimbau M, Rosen JM. The DNA-damage effector checkpoint kinase 1 is essential for chromosome segregation and cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:5159-64.
12. Zachos G, Black EJ, Walker M, Scott MT, Vagnarelli P, Earnshaw WC, et al. Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev Cell* 2007; 12:247-60.
13. Zachos G, Gillespie DA. Exercising restraints: role of Chk1 in regulating the onset and progression of unperturbed mitosis in vertebrate cells. *Cell Cycle* 2007; 6:810-3.
14. Stolz A, Ertych N, Kienitz A, Vogel C, Schneider V, Fritz B, et al. The CHK2-BRCA1 tumour suppressor pathway ensures chromosomal stability in human somatic cells. *Nat Cell Biol* 2010; 12:492-9.
15. Kellogg DR, Moritz M, Alberts BM. The centrosome and cellular organization. *Annu Rev Biochem* 1994; 63:639-74.



16. Doxsey S, McCollum D, Theurkauf W. Centrosomes in cellular regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21:411-34.
17. Doxsey S, Zimmerman W, Mikule K. Centrosome control of the cell cycle. *Trends Cell Biol* 2005; 15:303-11.
18. Loffler H, Lukas J, Bartek J, Kramer A. Structure meets function-centrosomes, genome maintenance and the DNA damage response. *Exp Cell Res* 2006; 312:2633-40.
19. Hinchcliffe EH, Miller FJ, Cham M, Khodjakov A, Sluder G. Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase. *Science* 2001; 291:1547-50.
20. Khodjakov A, Rieder CL. Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *J Cell Biol* 2001; 153:237-42.
21. Dutertre S, Descamps S, Prigent C. On the role of aurora-A in centrosome function. *Oncogene* 2004; 21:6175-83.
22. Schmitt E, Boutros R, Froment C, Monsarrat B, Ducommun B, Dozier C. CHK1 phosphorylates CDC25B during the cell cycle in the absence of DNA damage. *J Cell Sci* 2006; 119:4269-75.
23. Matsumoto Y, Maller JL. A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry. *Science* 2004; 306:885-8.
24. Mikule K, Delaval B, Kaldis P, Jurczyk A, Hergert P, Doxsey S. Loss of centrosome integrity induces p38-p53-p21-dependent G1-S arrest. *Nat Cell Biol* 2007; 9:160-7.
25. Busch C, Barton O, Morgenstern E, Gotz C, Gunther J, Noll A, et al. The G(2)/M checkpoint phosphatase cdc25C is located within centrosomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2007.
26. Hsu LC, White RL. BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:12983-8.
27. Ciciarello M, Mangiacasale R, Casenghi M, Zaira Limongi M, D'Angelo M, Soddu S, et al. p53 displacement from centrosomes and p53-mediated G1 arrest following transient inhibition of the mitotic spindle. *J Biol Chem* 2001; 276:19205-13.
28. Tritarelli A, Oricchio E, Ciciarello M, Mangiacasale R, Palena A, Lavia P, et al. p53 localization at centrosomes during mitosis and postmitotic checkpoint are ATM-dependent and require serine 15 phosphorylation. *Mol Biol Cell* 2004; 15:3751-7.

29. Shinmura K, Bennett RA, Tarapore P, Fukasawa K. Direct evidence for the role of centrosomally localized p53 in the regulation of centrosome duplication. *Oncogene* 2007; 26:2939-44.
30. Takada S, Kelkar A, Theurkauf WE. Drosophila checkpoint kinase 2 couples centrosome function and spindle assembly to genomic integrity. *Cell* 2003; 113:87-99.
31. Tsvetkov L, Xu X, Li J, Stern DF. Polo-like kinase 1 and Chk2 interact and co-localize to centrosomes and the midbody. *J Biol Chem* 2003; 278:8468-75.
32. Hong Y, Stambrook PJ. Restoration of an absent G1 arrest and protection from apoptosis in embryonic stem cells after ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:14443-8.
33. Shen K, Wang Y, Brooks SC, Raz A, Wang YA. ATM is activated by mitotic stress and suppresses centrosome amplification in primary but not in tumor cells. *J Cell Biochem* 2006; 99:1267-74.
34. Oricchio E, Saladino C, Iacovelli S, Soddu S, Cundari E. ATM is activated by default in mitosis, localizes at centrosomes and monitors mitotic spindle integrity. *Cell Cycle* 2006; 5:88-92.
35. Zhang S, Hemmerich P, Grosse F. Centrosomal localization of DNA damage checkpoint proteins. *J Cell Biochem* 2007; 101:451-65.
36. Tembe V, Henderson BR. Protein trafficking in response to DNA damage. *Cell Signal* 2007; 19:1113-20.
37. Cappelli E, Townsend S, Griffin C, Thacker J. Homologous recombination proteins are associated with centrosomes and are required for mitotic stability. *Exp Cell Res* 2011; 317:1203-13.
38. De Souza CP, Ellem KA, Gabrielli BG. Centrosomal and cytoplasmic Cdc2/cyclin B1 activation precedes nuclear mitotic events. *Exp Cell Res* 2000; 257:11-21.
39. Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* 2003; 5:143-8.
40. Lammer C, Wagerer S, Saffrich R, Mertens D, Ansorge W, Hoffman I. The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J Cell Sci* 1998; 111:2445-53.
41. Lindqvist A, Kallstrom H, Lundgren A, Barsoum E, Rosenthal C. Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. *J Cell Biol* 2005; 171:35-45.

42. Enomoto M, Goto H, Tomono Y, Kasahara K, Tsujimura K, Kiyono T, et al. Novel positive feedback loop between Cdk1 and Chk1 in the nucleus during G2/M transition. *J Biol Chem* 2009; 284:34223-30.
43. Matsuyama M, Goto H, Kasahara K, Kawakami Y, Nakanishi M, Kiyono T, et al. Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry. *J Cell Sci* 2011; 124:2113-9.
44. Sibon OC, Kelkar A, Lemstra W, Theurkauf WE. DNA-replication/DNA-damage-dependent centrosome inactivation in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol* 2000; 2:90-5.
45. Golan A, Pick E, Tsvetkov L, Nadler Y, Kluger H, Stern DF. Centrosomal Chk2 in DNA damage responses and cell cycle progression. *Cell Cycle* 2010; 9.
46. Jallepalli PV, Lengauer C, Vogelstein B, Bunz F. The Chk2 tumor suppressor is not required for p53 responses in human cancer cells. *J Biol Chem* 2003; 278:20475-9.
47. Gillingham AK, Munro S. The PACT domain, a conserved centrosomal targeting motif in the coiled-coil proteins AKAP450 and pericentrin. *EMBO Rep* 2000; 1:524-9.
48. Ahn J, Urist M, Prives C. The Chk2 protein kinase. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3:1039-47.
49. Petronczki M, Lenart P, Peters JM. Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Dev Cell* 2008; 14:646-59.
50. Archambault V, Glover DM. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10:265-75.
51. Steegmaier M, Hoffmann M, Baum A, Lenart P, Petronczki M, Krssak M, et al. BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. *Curr Biol* 2007; 17:316-22.
52. Lenart P, Petronczki M, Steegmaier M, Di Fiore B, Lipp JJ, Hoffmann M, et al. The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Curr Biol* 2007; 17:304-15.
53. Mayer TU, Kapoor TM, Haggarty SJ, King RW, Schreiber SL, Mitchison TJ. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* 1999; 286:971-4.
54. Lotti LV, Ottini L, D'Amico C, Gradini R, Cama A, Belleudi F, et al. Subcellular localization of the BRCA1 gene product in mitotic cells. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 35:193-203.

55. Sankaran S, Starita LM, Groen AC, Ko MJ, Parvin JD. Centrosomal microtubule nucleation activity is inhibited by BRCA1-dependent ubiquitination. *Mol Cell Biol* 2005; 25:8656-68.
56. Sankaran S, Crone DE, Palazzo RE, Parvin JD. Aurora-A kinase regulates breast cancer associated gene 1 inhibition of centrosome-dependent microtubule nucleation. *Cancer Res* 2007; 67:11186-94.
57. Sankaran S, Crone DE, Palazzo RE, Parvin JD. BRCA1 regulates gamma-tubulin binding to centrosomes. *Cancer Biol Ther* 2007; 6:1853-7.
58. Parvin JD. The BRCA1-dependent ubiquitin ligase, gamma-tubulin, and centrosomes. *Environ Mol Mutagen* 2009; 50:649-53.
59. Kapoor TM, Mayer TU, Coughlin ML, Mitchison TJ. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J Cell Biol* 2000; 150:975-88.
60. Cochran JC, Gatial JE, 3rd, Kapoor TM, Gilbert SP. Monastrol inhibition of the mitotic kinesin Eg5. *J Biol Chem* 2005; 280:12658-67.
61. Varmark H, Kwak S, Theurkauf WE. A role for Chk2 in DNA damage induced mitotic delays in human colorectal cancer cells. *Cell Cycle* 2010; 9:312-20.
62. Stolz A, Bastians H. A novel role for Chk2 after DNA damage in mitosis? *Cell Cycle* 2010; 9:25-6.
63. Campeau E, Ruhl VE, Rodier F, Smith CL, Rahmberg BL, Fuss JO, et al. A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One* 2009; 4:e6529.
64. Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, Raza SR, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 2009; 11:973-9.
65. Hansen DV, Loktev AV, Ban KH, Jackson PK. Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC inhibitor Emi1. *Mol Biol Cell* 2004; 15:5623-34.
66. Wang J, Beauchemin M, Bertrand R. Phospho-Bcl-xL(Ser62) plays a key role at DNA damage-induced G2 checkpoint. *Cell Cycle* 2012; 11:2159-69.

## **DISCUSSION**

Le travail réalisé pendant ma Maîtrise s'est intéressé à deux questions principales. La première interroge si effectivement la kinase CHK2 possède, tel que récemment suggéré dans la littérature, une localisation centrosomale dans les cellules et si oui à quel moment du cycle cellulaire. Notre seconde question explore la possibilité de rôles pour cette sous-population centrosomale de CHK2 dans la régulation de l'entrée et la progression en mitose ainsi que dans la réponse aux dommages à l'ADN en mitose.

### **La localisation centrosomale de CHK2 remise en question**

#### **Localisation de CHK2 en interphase**

L'idée d'une localisation centrosomale pour CHK2 n'est pas nouvelle : au cours des dernières années, plusieurs travaux ont mis en évidence la présence d'une sous-population de CHK2 aux centrosomes de cellules en interphase en utilisant des techniques d'immunofluorescence (IF) indirecte sur cellules fixées ou des extraits protéiques de centrosomes purifiés sur gradient de sucrose [2, 86, 267]. Des études dans des cellules souches embryonnaires (ES) et des embryons de drosophiles ont montré que la grande majorité de la protéine CHK2 est localisée aux centrosomes dans ces modèles [264, 266]. CHK2 a aussi été détectée sur les centrosomes dans les lignées cellulaires cancéreuses U2OS et 293T et les anticorps utilisés dans ces expériences d'IF étaient essentiellement des anticorps phospho-spécifiques dirigés contre les formes phosphorylées de CHK2 sur la T68 ou les T383/387 [2, 86]. Dans l'article publié par Tsvetkov et al., la localisation de CHK2 aux centrosomes a aussi été mise en évidence en exprimant une protéine de fusion HA-CHK2 dans les cellules et en utilisant un anticorps anti-HA pour l'immunomarquage des cellules fixées suite à une étape de pré-extraction au détergent Triton X-100 [2]. Récemment, A. Golan et al., ont montré une localisation cycle cellulaire-dépendante de CHK2 aux centrosomes en absence de dommages à l'ADN. Leurs observations, basées sur la technique de purification des centrosomes sur gradient de sucrose à partir de cellules synchronisées en phase S, indiquent qu'une sous-population de CHK2 est localisée aux

centrosomes des cellules en interphase et en mitose [267]. Malgré toutes ces évidences supportant une localisation centrosomale pour une sous-population de la kinase CHK2, ces résultats demeurent controversés notamment à cause de l'utilisation d'anticorps phospho-spécifiques qui souvent manquent de spécificité dans les expériences d'IF et nécessitent des contrôles très rigoureux.

En 2004, le groupe de J. Lukas a publié un article dans *Nature Cell Biology* démontrant une localisation centrosomale pour la kinase CHK1. Dans cet article il est montré qu'une sous-population de CHK1 s'associe aux centrosomes dupliqués dans les cellules en fin de phase G2 pour y réguler négativement l'activité du complexe mitotique Cdk1-CyclineB. Ce groupe a proposé que la protéine CHK1 centrosomale régule l'activité du complexe Cdk1-CyclineB en inhibant la phosphatase Cdc25B, un activateur important du complexe Cdk1-CyclineB, empêchant de cette façon l'entrée prématurée des cellules en mitose [86]. Cette nouvelle fonction de CHK1 dans la régulation de l'entrée en mitose aux centrosomes, a par la suite été confirmée dans des publications subséquentes [87, 318, 374]. Alors que le modèle de la régulation centrosomale de l'entrée en mitose par CHK1 est généralement accepté, le groupe du Dr. M. Inagaki propose un modèle différent où CHK1 inhibe le complexe Cdk1-CyclineB dans le noyau et non aux centrosomes [375]. Dans une publication très récente, ce groupe démontre que l'anticorps utilisé pour révéler CHK1 aux centrosomes détecte plutôt la protéine centrosomale Ccdc151 dont la fonction demeure inconnue [376]. Ces observations contradictoires concernant la localisation de CHK1 aux centrosomes viennent amplifier le doute qui plane quant à la robustesse des approches employées pour mettre en évidence la localisation d'une protéine aux centrosomes. Conséquemment, la présence aux centrosomes des kinases CHK1 et CHK2 de la réponse aux dommages à l'ADN demeure à ce jour matière à débat.

Nos expériences d'IF montrent que l'anticorps polyclonal de lapin (H-300) dirigé contre les résidus 1-300 en N-terminal de CHK2 et l'anticorps monoclonal dirigé contre la forme phosphorylée de CHK2 sur la T68 (pT68-CHK2) marquent les centrosomes des cellules U2OS fixées au méthanol 100 % . Pour tester la spécificité de ces anticorps, nous avons répété la technique d'IF sur la lignée cancéreuse colorectale HCT116 CHK2<sup>-/-</sup> établie

par le groupe de F. Bunz en 2003 [377]. Dans les cellules HCT116  $CHK2^{-/-}$ , les anticorps H-300 et pT68-CHK2 donnent un marquage centrosomal hautement similaire aux marquages obtenus avec la lignée contrôle parentale HCT116<sup>wt</sup> (Figure 1B). Les cellules HCT116  $CHK2^{-/-}$  ont été générées en supprimant, par recombinaison homologue, 160 pb dans l'exon encodant le domaine kinase de CHK2. Par conséquent, la possibilité que ces cellules HCT116  $CHK2^{-/-}$  expriment une forme tronquée et inactive de CHK2, difficilement détectable par analyse western, mais générant un signal aux centrosomes en IF, ne peut être exclue. Nous avons donc développé un modèle de lignées cellulaires U2OS dans lesquelles l'expression de CHK2 endogène a été inhibée par des ARN interférents (shRNAs) qui ciblent soit l'extrémité N-terminale du transcrite de CHK2 (shRNAs #2 et 3) ou sa portion régulatrice non codante en 3' (shRNA #1). Les Figures 2B et 2D de l'article montrent que dans toutes nos lignées cellulaires U2OS dans lesquelles l'expression de CHK2 a été réprimée, le signal centrosomal généré par les anticorps anti-CHK2, H-300 et pT68-CHK2 est similaire à celui de la lignée contrôle. Comme l'œil humain est très peu sensible aux différences de brillance dans la gamme élevée des intensités, nous avons confirmé nos résultats par une approche de mesure quantitative du signal centrosomal. Dans ce but, nous avons développé une routine d'analyse des images numériques qui mesure l'intensité du signal de fluorescence généré par les anticorps anti-CHK2 H-300 et pT68-CHK2 aux centrosomes. Ces quantifications présentées dans les figures 2C et 2E de l'article, confirment qu'il n'y a pas de diminution du signal centrosomal généré par les anticorps anti-CHK2 H-300 ou CHK2-pT68 lorsque l'expression de la protéine CHK2 est inhibée dans les cellules U2OS. Notre technique d'analyse informatique a été validée à l'aide de la lignée cellulaire U2OS exprimant la protéine de fusion GFP-PACT sous le contrôle d'un promoteur doxycycline-inductible (Figure 2F, 2G et 2H). Ces résultats démontrent que les anticorps anti-CHK2 H-300 et CHK2-pT68 sont, dans nos conditions expérimentales d'IF, non spécifiques et reconnaissent probablement des antigènes autres que CHK2 sur les centrosomes des cellules U2OS.

Il est important de mentionner que nous avons testé presque tous les anticorps anti-CHK2 disponibles sur le marché soit les anticorps dirigés contre le domaine N-terminal ou

la protéine CHK2 totale (H-300 et DCS-273 de SantaCruz), et les anticorps dirigés contre les formes phosphorylées de CHK2 (phospho-CHK2 C13C1 de Cell Signaling, phospho-CHK2-T68 Lot#6 et Lot#9 de Cell Signaling, phospho-CHK2-T68-R de SantaCruz, phospho-CHK2-T68 d'Abcam, phospho-CHK2-S19, -S33/35, -T387 et -T432 de Cell Signaling). Seuls certains anticorps dirigés contre la forme pT68-CHK2 et l'anticorps H-300 ont généré un signal centrosomal dans nos conditions expérimentales. Nous avons également testé, lors de la mise au point des expériences d'immunofluorescence, plusieurs méthodes de fixation, de blocage et d'hybridation. Dans nos mains, la fixation des cellules à la paraformaldéhyde (PFA) 3,7% ne permettait pas la visualisation des centrosomes à l'aide des anticorps anti- $\gamma$ -Tubuline, un prérequis pour la réalisation de nos expériences. La méthode de fixation au méthanol 100% est utilisée dans la très grande majorité des publications étudiant les centrosomes et c'est d'ailleurs uniquement par cette méthode que nous avons pu révéler les centrosomes avec les anticorps anti- $\gamma$ -Tubuline. Dans toutes les conditions testées avec la fixation au méthanol, les anticorps anti-CHK2 H-300 et pT68-CHK2 ont généré un marquage centrosomal dans les cellules HCT116 CHK2<sup>-/-</sup>. Nous pouvons donc conclure que pour le moment, la technique d'immunofluorescence indirecte dirigée contre CHK2 avec les anticorps disponibles sur le marché n'est pas une approche valable pour en étudier la localisation subcellulaire de CHK2.

Une autre méthode couramment utilisée pour démontrer la localisation centrosomale d'une protéine consiste à analyser des extraits protéiques de centrosomes purifiés sur gradient de sucrose [267]. Les fractions enrichies en centrosomes sont identifiées grâce à la présence de protéines centrosomales telles que la  $\gamma$ -Tubuline ou la Centrine qui sont facilement détectable par western blot. Au laboratoire nous avons réalisé des expériences de purification de centrosomes à partir de cellules HeLa S3, un sous-type de cellules HeLa supportant la culture en suspension (résultats non montrés). Dans les fractions enrichies en centrosomes, nous avons révélé par western blot, la présence de  $\gamma$ -Tubuline, Centrine et de CHK2. Nous avons également interrogé la pureté de nos fractions en produisant des westerns blots dirigés contre les protéines VDAC, les Lamines A/C et LAMP-1 qui sont des marqueurs des mitochondries, du noyau et du compartiment cytoplasmique



respectivement. Nous avons constaté que les fractions enrichies en centrosomes étaient fortement contaminées par des protéines nucléaires. Comme CHK2 est une protéine majoritairement nucléaire, il nous a donc été impossible de statuer à l'effet que la protéine CHK2 détectée dans les fractions enrichies en centrosomes provient effectivement des centrosomes et non d'une contamination due à la co-purification de noyaux. Il est intéressant de mentionner que la technique de purification des centrosomes a été utilisée dans plusieurs publications qui présentent rarement les contrôles nécessaires pour évaluer les contaminations nucléaire, mitochondriale et cytoplasmique. On peut donc émettre des réserves quant à la robustesse des données publiées par le groupe A. Golan et al. montrant la présence de CHK2 dans des extraits de centrosomes purifiés sur gradient de sucrose [267].

### **Localisation de CHK2 dans les cellules en Mitose**

Étant donné que l'immunofluorescence indirecte ne nous a pas permis de vérifier la localisation centrosomale de CHK2, nous avons établi des lignées stables de cellules U2OS doxycycline-inductibles exprimant les protéines de fusion GFP-CHK2 ou FLAG-CHK2 (Figure 3A). Ces lignées inductibles ont été utilisées pour révéler la localisation de CHK2 soit par IF directe (lignée GFP-CHK2), soit par IF indirecte en utilisant l'anticorps anti-FLAG (lignée FLAG-CHK2). La figure 3B de l'article montre que des sous-populations de GFP-CHK2 et FLAG-CHK2 localisent clairement sur les centrosomes dans les cellules en mitose, du début de la prophase jusqu'en télophase et au mid-body en cytokinèse. À la différence des observations faites en utilisant des anticorps anti-CHK2, nous n'avons pas détecté de signal centrosomal dans les cellules en interphase, où les protéines GFP-CHK2 et FLAG-CHK2 présentaient une localisation exclusivement nucléaire. Comme il n'était pas exclu que les protéines GFP-CHK2 et FLAG-CHK2 puissent se lier aux extrémités proximales des microtubules émergeant des centrosomes et non aux centrosomes eux-mêmes, nous avons traité les cellules avec 10  $\mu$ M nocodazole afin de dépolymériser complètement le cytosquelette de microtubules. La figure supplémentaire 2 de l'article montre que même en absence de microtubules, les protéines GFP-CHK2 et FLAG-CHK2

sont clairement détectées sur les centrosomes mitotiques, confirmant la localisation de CHK2 aux centrosomes indépendamment de la présence de microtubules.

Pour valider cette approche, nous avons également généré des lignées U2OS stables exprimant les protéines doxycycline-inductibles GFP, GFP-CHK1 et FLAG-CHK1. Par IF directe, nous montrons dans les figures supplémentaires 3B et 3C de l'article que les protéines contrôle GFP et GFP-CHK1 sont associées aux centrosomes ni en interphase, ni en mitose. L'utilisation de l'anticorps anti-FLAG ne permet pas non plus de révéler une localisation centrosomale pour FLAG-CHK1 (Figure supplémentaire 3D). Ces résultats suggèrent donc que la localisation centrosomale des protéines GFP-CHK2 et FLAG-CHK2, mise en évidence dans les cellules U2OS en mitose, n'est pas consécutive d'une non-spécificité due à la surexpression des protéines de fusion dans les cellules. Les résultats d'immunofluorescence, obtenus avec les cellules U2OS-GFP-CHK1 et U2OS-FLAG-CHK1, sont également d'intérêt dans le contexte actuel de la recherche sur CHK1 dont la localisation aux centrosomes a été remise en question récemment. Bien que le groupe de J. Lukas ait montré une localisation et une fonction centrosomale pour CHK1 dans les cellules en interphase, ces résultats ont récemment été contredits par l'équipe de M. Inagaki qui démontre l'absence de localisation centrosomale pour CHK1 endogène et les protéines de fusion FLAG-CHK1 et Myc-CHK1 dans les cellules HeLa [86, 376]. Nos résultats d'immunofluorescence supportent le nouveau modèle proposé par le groupe de M. Inagaki selon lequel CHK1, au lieu d'inhiber l'activation du complexe Cdk1-CyclineB aux centrosomes à la transition G2/M du cycle cellulaire, régule plutôt le complexe Cdk1-CyclineB directement dans le noyau [375, 376].

Bien que nous ayons utilisé les lignées contrôles U2OS-GFP, U2OS-GFP-CHK1 et U2OS-FLAG-CHK1 pour valider la localisation centrosomale de GFP-CHK2 et FLAG-CHK2 observée en mitose, nos résultats pourraient être systématiquement biaisés par la technique d'immunofluorescence sur cellules fixées. La fixation qui est une étape clef de la technique d'immunofluorescence a pour but d'immobiliser la mécanique cellulaire et de la préserver dans un état le plus fidèle possible à son état vivant. La méthode de fixation utilisée dans nos expériences, qui est une fixation chimique au méthanol 100%, déshydrate

les protéines et diminue la polarité du milieu cellulaire résultant en la coagulation des protéines. De plus, le méthanol solubilise les lipides qui constituent les membranes cellulaires, ne laissant en place que la charpente protéique sous-jacente [378]. Ainsi, dans les cellules fixées au méthanol 100%, les protéines marquées sont potentiellement bien loin de leur structure tertiaire physiologique. Cette méthode de fixation peut donc donner lieu à des interactions et des localisations non spécifiques pour certaines protéines. Ces artéfacts de localisation possibles, qui sont indépendants des anticorps utilisés, mais inhérents à la méthode de fixation, ne peuvent être corrigés que par un changement de méthode de fixation. Tel que mentionné plus tôt, puisque seule la fixation au méthanol 100 % nous a permis de révéler les centrosomes dans nos doubles marquages anti- $\gamma$ Tubuline/anti-CHK2, un changement de méthode de fixation n'est pas envisageable. Par conséquent, pour confirmer de façon alternative la localisation centrosomale de CHK2 en mitose, nous avons interrogé la localisation de CHK2 *in vivo* par vidéomicroscopie dans la lignée inducible U2OS-GFP-CHK2. Les résultats, présentés à la figure 4 et dans les vidéos supplémentaires 1 et 2, montrent clairement une localisation centrosomale pour la protéine GFP-CHK2 dans les cellules en mitose, à partir de la prométaphase précoce jusqu'en anaphase. Dans les cellules en métaphase, GFP-CHK2 semble s'accumuler également sur le fuseau mitotique. Dans les cellules contrôles U2OS-GFP, aucun enrichissement de la protéine GFP sur une structure particulière n'est observé, la protéine GFP demeurant pan-cellulaire tout au long de la mitose. Ces résultats suggèrent donc que la localisation centrosomale des protéines GFP-CHK2 et FLAG-CHK2 par IF sur cellules fixées n'est pas un artéfact généré par la méthode de fixation des cellules. Par les expériences d'IF sur cellules fixées, nous avons clairement montré la localisation centrosomale de GFP-CHK2 et FLAG-CHK2 en mitose à partir de la fin de la prophase jusqu'à la cytokinèse. Nos expériences de vidéomicroscopie révèlent, quant à elles, une localisation centrosomale de GFP-CHK2 à partir de la prométaphase jusqu'en anaphase. Nous pensons que la raison de cette différence est probablement technique et due au fait qu'une cellule en mitose est très dynamique et bouge énormément. En vidéomicroscopie, à moins d'être pourvu d'un laser qui mesure la distance focale d'une cible cellulaire précise (tracking), il est très difficile de conserver une structure

donnée au foyer, particulièrement quand elle est aussi petite (1  $\mu\text{m}$ ) et mobile qu'un centrosome dans une cellule en division. Conséquemment, nous pensons que GFP-CHK2 est probablement associée aux centrosomes tout au long de la mitose dans les cellules vivantes tel qu'observé par IF sur cellules fixées. Cependant, les limitations techniques inhérentes à la vidéomicroscopie ne permettent pas de bien voir la protéine dans toutes les phases de la mitose, notamment la télophase et la cytokinèse.

Plk1 est une kinase centrale de la mitose régulant tant son initiation via l'activation des complexes Cdk1-CyclineB que sa progression jusqu'en cytokinèse. Plk1 localise sur les centrosomes et les kinétochores en début de mitose, sur le fuseau mitotique central en anaphase puis au mid-body en cytokinèse [379, 380]. Il a également été montré que Plk1 et CHK1 interagissent au niveau des centrosomes ainsi qu'au mid-body [2]. Nous avons donc investigué si Plk1 est nécessaire pour le recrutement de CHK2 aux centrosomes en début de mitose. La figure 5 de l'article montre que l'inhibition de l'activité kinase de Plk1, soit par un inhibiteur pharmacologique (BI2536) ou avec des ARNs interférents dirigés contre Plk1, abroge la localisation centrosomale de CHK2. Ces résultats suggèrent également que la localisation de la sous-population centrosomale de CHK2 dépend de l'activité kinase de Plk1 et non pas uniquement d'une interaction protéine-protéine (docking sites) entre Plk1 et CHK2. L'inhibition de Plk1 semble donc prévenir l'association des protéines GFP-CHK2 et FLAG-CHK2 avec les centrosomes à partir du début de la prométaphase jusqu'en métaphase (Figure 5B). Dans ces expériences, il ne nous a pas été possible d'investiguer si l'activité de Plk1 est requise à la localisation centrosomale de CHK2 au cours des phases plus tardives de la mitose (anaphase, télophase et cytokinèse) puisque l'inhibition de Plk1 bloque les cellules en prométaphase et en métaphase [381]. Toutefois, nos résultats montrent clairement que le recrutement des protéines GFP-CHK2 et FLAG-CHK2 sur les centrosomes mitotiques dépend de l'activité kinase de Plk1. Ces résultats qui mettent en évidence un lien fonctionnel entre la localisation centrosomale des protéines GFP-CHK2 et FLAG-CHK2 et l'activité kinase de Plk1, augmentent significativement la crédibilité de nos observations faites par IF.

En conclusion, par ces différentes approches, nous sommes confiants de répondre à la question controversée de la localisation centrosomale de CHK2 au cours du cycle cellulaire. Nous montrons qu'une sous-population de CHK2 est retrouvée aux centrosomes dans les cellules en mitose et que cette localisation dépend de l'activité kinase de Plk1. Ces expériences supportent ainsi l'idée nouvelle suggérée par le groupe de H. Bastians, à l'effet que CHK2 tiendrait une fonction dans l'assemblage du fuseau mitotique et la progression des cellules en mitose en absence de dommages à l'ADN [263].

## **Fonctions potentielles de CHK2 en mitose**

Pour tenter d'explorer la ou les fonctions potentielle(s) de la sous-population centrosomale de CHK2 en mitose, nous avons établi un système de lignées cellulaires U2OS doxycycline-inductibles qui expriment la protéine GFP contrôle, la protéine de fusion GFP-CHK2 sauvage (wt) ou la kinase mutée inactive GFP-CHK2(D347A), fusionnées au domaine PACT(AKAP450) qui dirige les protéines exprimées sur les centrosomes [86, 382]. Par des expériences de cytométrie de flux dans lesquelles nous mesurons la disparition du marqueur de cellules mitotiques phospho-HistoneH3(S10), nous avons comparé la cinétique de sortie de mitose de ces trois lignées cellulaires après le relargage des cellules d'un blocage en prométaphase par le nocodazole (résultats non montrés). Nous avons observé que l'expression de ces protéines de fusion aux centrosomes ralentit dramatiquement la vitesse de progression des cellules en mitose et diminue significativement la capacité des cellules à survivre à la mitose. Ce phénotype, qui s'est avéré indépendant de CHK2, résulte probablement d'une saturation des centrosomes par les protéines chimères surexprimées, empêchant ainsi les centrosomes d'exécuter leurs fonctions physiologiques importantes en mitose.

Pour évaluer la fonction de CHK2 en mitose, nous avons donc poursuivi nos investigations en utilisant le modèle de lignées cellulaires U2OS exprimant constitutivement les shRNAs dirigés contre la protéine CHK2. Toutefois, il est important de souligner que ces lignées cellulaires permettent de questionner le rôle de la kinase CHK2 exprimée de façon pan-cellulaire et non la fonction spécifique de la sous-population

centrosomale de CHK2. Par des expériences de cytométrie de flux mesurant le marqueur mitotique phospho-HistoneH3(S10) nous avons comparé les cinétiques de progression en mitose des lignées U2OS contrôles non transduites ou transduites avec shGFP avec celles des cellules CHK2-déficientes (shRNA 1 et shRNA 2+3). À la figure supplémentaire 4A, nous montrons qu'il n'y a pas de différence significative entre les 3 lignées suggérant que l'absence de CHK2 n'a pas d'impact visible sur la progression des cellules de la prométaphase jusqu'à la sortie des cellules de la mitose. Par ailleurs, la quantification des cellules dans chaque phase de la mitose, 45 minutes suivant la levée du blocage au nocodazole, montre qu'il n'y a pas de différences significatives entre les lignées contrôles et les lignées CHK2-déficientes dans la distribution des cellules entre les différentes phases de la mitose (Figure supplémentaire 4B). Ces résultats suggèrent que CHK2 ne contribue pas à la régulation de la progression de la mitose dans les cellules U2OS. Bien que ces résultats ne soient pas en accord avec les observations faites par A. Stolz et son équipe qui montrent qu'une absence de CHK2 occasionne un retard dans la progression de la mitose, il est possible que notre approche n'ait pas été suffisamment sensible pour permettre la mise en évidence d'un tel phénotype dans nos cellules U2OS CHK2-déficientes. En plus des défauts dans la formation du fuseau mitotique, il est important de mentionner que Stolz et al. ont mis en évidence, par une approche de vidéomicroscopie, un retard moyen de 20 min dans la progression en mitose des cellules HCT116 CHK2<sup>-/-</sup> comparativement aux cellules HCT116 [263]. Il est donc plausible qu'un retard aussi petit ne puisse pas être révélé par notre approche qui mesure la disparition du marqueur phospho-HistoneH3(S10) par cytométrie de flux à des intervalles de 45 min seulement. Dans nos expériences, les cellules sont accumulées en mitose grâce à un traitement au nocodazole pendant 16 h. Cette population de cellules soi-disant synchronisée en prométaphase est en fait très hétérogène puisque les cellules sont arrêtées en prométaphase depuis des temps très variables pouvant aller de quelques minutes à 16 h, dépendamment de leur position dans le cycle au moment de l'ajout du nocodazole et donc de leur arrivée en mitose. On peut penser que cette hétérogénéité au sein de nos populations de cellules pourrait nuire à la détection d'un retard aussi subtil que 20 minutes dans la durée de la mitose.

L'équipe de Stolz a montré que l'absence de CHK2 conduit à des fuseaux mitotiques malformés qui favorisent l'instabilité chromosomique (CIN). De plus, elle a montré que CHK2 phosphoryle BRCA1 sur la S988 pour exercer sa fonction au niveau du fuseau mitotique [263]. Il s'agit là d'un tout nouveau rôle pour CHK2 qui ne s'inscrit pas dans le contexte usuel de la réponse aux dommages à l'ADN. D'autres études ont aussi montré que la protéine BRCA1 localise aux centrosomes en interphase et en mitose et qu'elle inhibe la nucléation des microtubules aux centrosomes, une étape importante de l'entrée en mitose [321, 383-386]. Toutes ces données nous ont donc amenés à questionner la possibilité que CHK2 puisse réguler, via son interaction avec BRCA1 aux centrosomes, la nucléation des microtubules en début de mitose. Les essais de nucléation des microtubules que nous avons réalisés montrent qu'il n'y a pas de différences apparentes dans la cinétique de polymérisation ou de croissance des microtubules entre les lignées CHK2-déficientes et la lignée contrôle (Figure supplémentaire 4C). Ces résultats suggèrent que CHK2 n'est pas impliquée dans la nucléation des Mt aux centrosomes en début de mitose dans les cellules U2OS. Toutefois, il est important de nuancer cette conclusion, car le degré hautement dynamique de la nucléation des microtubules et sa grande dépendance à la température en font un phénomène extrêmement difficile à mesurer de façon reproductible. Par exemple, suite au lavage des cellules, des quantités résiduelles de nocodazole, de l'ordre de quelques nM seulement, peuvent ralentir la cinétique de repolymérisation des Mt [387]. Aussi, compte tenu de l'extrême rapidité de la polymérisation des Mt, un court délai dans la manipulation des échantillons peut avoir un impact sur le résultat. En conclusion, si l'absence CHK2 dans les cellules U2OS CHK2-déficientes a un effet subtil sur la polymérisation des Mt nos essais de repolymérisation des Mt, tels que nous les avons réalisés, ne permettent probablement pas de révéler cette fonction de CHK2.

Notre quête d'un rôle pour CHK2 en mitose nous a également amenés à investiguer si CHK2 a un rôle en mitose en présence de problèmes d'attachement des chromosomes. Pour tester cette hypothèse nous avons traité les lignées U2OS contrôles et CHK2-déficientes avec le monastrol, un inhibiteur de la kinésine Eg5/KSP. Ce composé connu

pour créer des attachements erronés entre les chromosomes et les Mt occasionne des problèmes de congression des chromosomes sur la plaque métaphasique [388, 389]. Les expériences, présentées en figure supplémentaire 5A, montrent qu'environ 50 % des cellules U2OS traitées au monastrol possèdent au moins un chromosome non aligné en métaphase, et ce indépendamment de la présence de CHK2. Par ailleurs, 45 min après lavage du monastrol, la distribution des cellules dans les différentes phases de la mitose est similaire entre les lignées CHK2-déficientes et les cellules contrôles, (Figure supplémentaire 5B). Ces expériences suggèrent donc que CHK2 n'est pas impliquée dans la progression en mitose en présence de problèmes d'attachement des chromosomes aux Mt.

Encore une fois, on peut mettre ces résultats en perspective compte tenu de la méthodologie employée et du modèle cellulaire utilisé. Dans l'expérience en figure supplémentaire 5B, nous avons évalué la distribution des cellules 45 minutes après la levée du blocage au monastrol. Il se pourrait qu'une analyse des cellules à des temps différents ait pu produire des résultats différents. Par exemple, les 70% de cellules encore bloquées en prométaphase 45 minutes après le lavage du monastrol, pourraient commencer à progresser en mitose plus tard et à ce moment présenter des cinétiques de progression différentes entre les lignées. Des expériences conduites à des temps d'observation différents après la levée du bloc monastrol répondraient à cette question. Les cellules U2OS utilisées dans ces expériences sont des cellules qui présentent un haut degré d'instabilité chromosomique [390]. Comme il a été montré qu'un SAC déficient peut être à l'origine d'instabilité chromosomique [289], il est concevable que la lignée U2OS puisse avoir un SAC dont l'activité est altérée. Si tel est le cas, ce modèle cellulaire peut ne pas être approprié pour la mise en évidence d'un rôle de CHK2 dans la mitose en réponse à des attachements erronés des chromosomes.

Bien que nos expériences conduites avec le modèle de lignées U2OS exprimant constitutivement des shRNAs dirigés contre CHK2 ne questionnent pas spécifiquement la fonction de la sous-population centrosomale de CHK2, ce modèle a permis d'évaluer la participation de la population cellulaire totale de CHK2 dans la progression en mitose, la nucléation des microtubules et la formation du fuseau mitotique.



Comme CHK2 est une kinase de la réponse aux dommages à l'ADN et qu'elle participe à la régulation de la mitose dans la lignée colorectale HCT116, nous nous sommes demandé si CHK2 avait une fonction en mitose en présence de lésions génotoxiques. Pour explorer cette question, nous avons réalisé une expérience préliminaire qui consiste à irradier les cellules en mitose avant de lever le blocage au nocodazole. La figure supplémentaire 5C montre que la progression des cellules U2OS en mitose ne semble pas affectée par les dommages à l'ADN induits par les radiations ionisantes. De plus, dans des cellules exposées à des doses de rayons- $\gamma$  allant de 0,25 à 5Gy, nous n'observons pas de différence entre les lignées CHK2-déficientes et la lignée contrôle. Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas de point de contrôle sensible aux dommages à l'ADN en mitose dans les cellules U2OS. S'il y avait eu un point de contrôle sensible aux dommages à l'ADN en mitose, nous aurions observé une accumulation des cellules dans une des phases de la mitose aux dépens de la phase suivante. D'après la littérature, la réponse des cellules mitotiques aux CDBs de l'ADN peut être très variable et dépend de la lignée cellulaire, du type de dommages et du moment où les dommages surviennent en mitose [391]. Il est tout à fait possible que notre expérience exploratoire n'ait pas réuni les conditions nécessaires pour mettre en évidence une réponse des U2OS au CDBs en mitose et conséquemment une fonction pour CHK2 dans cette réponse.

## PERSPECTIVES

Nous avons démontré qu'une sous-population de CHK2 avait une localisation centrosomale dans les cellules U2OS en mitose grâce à la fluorescence directe de la protéine GFP-CHK2<sup>wt</sup>, par des expériences d'immunofluorescence directe et indirecte sur cellules fixées et par vidéomicroscopie dans des cellules vivantes. Bien que nos résultats soient convaincants, il serait pertinent de répéter ces expériences dans des lignées primaires telles que les cellules fibroblastiques BJ, les cellules épithéliales IM90, ou dans des cellules normales immortalisées telles que les cellules RPE (Retinal Pigment Epithelium). L'observation d'une sous-population de CHK2 localisée aux centrosomes dans des cellules primaires non transformées augmenterait la valeur biologique de nos observations.

Également, comme nos études portent principalement sur le rôle fonctionnel de CHK2 dans la mitose et éventuellement son point de contrôle (SAC), il aurait peut-être été plus pertinent d'utiliser des modèles cellulaires dont le génome est stable comme par exemple les cellules RPE ou HCT116 qui ont des points de contrôle du cycle cellulaire fonctionnels. La nature transformée des cellules cancéreuses U2OS utilisées dans nos expériences a pu nous garder de révéler un rôle de CHK2 dans la régulation de la mitose et du SAC puisque ces cellules font beaucoup de mitoses aberrantes par défaut.

La seconde partie de mon travail a porté sur l'exploration de rôles potentiels pour CHK2 dans les cellules en mitose. Pour mettre en évidence un rôle de la sous-population centrosomale de CHK2 en mitose nous avons utilisé un système de lignées U2OS exprimant les protéines de fusion GFP-PACT, GFP-CHK2<sup>wt</sup>-PACT et GFP-CHK2<sup>D347A</sup>-PACT sous le contrôle d'un promoteur doxycycline-inductible. Les expériences réalisées avec ce modèle cellulaire nous ont enseigné que la surexpression de protéines sur les centrosomes est suffisante pour bouleverser considérablement les fonctions physiologiques normales des centrosomes. Pour contourner ce problème et permettre l'étude de la fonction centrosomale de CHK2 en mitose, une mise au point plus fine du modèle pourrait être menée. Comme le niveau d'expression des protéines de fusions GFP-PACT, GFP-CHK2<sup>wt</sup>-PACT et GFP-CHK2<sup>D347A</sup>-PACT est sensible à la concentration de doxycycline ajoutée dans le milieu extracellulaire, la mise au point du modèle consiste à essayer de diminuer

l'expression des protéines chimères jusqu'à un seuil à partir duquel on n'observe plus d'effet non spécifique sur la fonction des centrosomes en mitose. Cet ajustement pourrait être faisable en nous basant sur la réponse des cellules U2OS contrôles non transduites et celle des cellules exprimant GFP-PACT. Après avoir déterminé le seuil d'expression de la protéine contrôle GFP-PACT pour lequel le comportement cellulaire n'est pas altéré, nous pourrions tenter d'ajuster les concentrations de doxycycline pour induire une expression équivalente aux centrosomes des protéines GFP-CHK2<sup>wt</sup>-PACT et GFP-CHK2<sup>D347A</sup>-PACT dans les autres lignées. Pour faire cet ajustement, l'expression centrosomale des protéines de fusion pourra être contrôlée grâce à la technique de quantification du signal d'IF aux centrosomes que nous avons développée. Si nous sommes en mesure d'ajuster notre modèle cellulaire, nous pourrions questionner la fonction spécifique de la sous-population centrosomale de CHK2 en mitose. Toutefois, la plupart du temps l'expression de gènes sous le contrôle d'un promoteur doxycycline-inductible est difficilement contrôlable avec précision et il est probable que ne soyons pas capables de réaliser les ajustements nécessaires pour répéter nos expériences dans de bonnes conditions.

Puisque les expériences effectuées avec notre modèle de lignées cellulaires U2OS CHK2-déficientes ne nous ont pas permis de mettre en évidence un rôle pour CHK2 en mitose, nous croyons qu'un changement d'approche s'impose pour augmenter la sensibilité de nos expériences. Nous pensons qu'un des problèmes dans nos expériences pourrait être la synchronisation des cellules au nocodazole où le temps de blocage en début de mitose est très hétérogène dans la population cellulaire. L'observation du comportement des cellules dans un contexte plus physiologique est certainement plus appropriée. Il serait donc indiqué d'étudier le comportement des cellules contrôles et CHK2-déficientes en mitose par vidéomicroscopie. Le comportement cellulaire peut ainsi être évalué de façon individuelle et de façon beaucoup plus précise dans le temps. Ce type d'expérience est donc beaucoup plus sensible et pourrait permettre de mettre en évidence un effet de la perte de CHK2 dans le déroulement temporel de la mitose. Cette approche permet une analyse du comportement individuel des cellules qui minimise la variabilité des observations et conséquemment augmente la sensibilité de nos expériences.

Bien que les expériences de nucléation des microtubules suggèrent qu'il n'y a pas de rôle pour CHK2 dans la nucléation et la croissance des Mt en début de mitose, nous

pensons que l'essai pourrait être amélioré afin d'en augmenter la sensibilité et la reproductibilité. Le développement d'une technique de quantification du taux de polymérisation des microtubules augmenterait significativement la sensibilité de la technique pour permettre peut-être la mise en évidence de différences potentiellement subtiles entre les cellules CHK2-déficientes et les cellules contrôles.

Depuis quelques années, un nouvel axe de régulation des voies de la réponse aux dommages à l'ADN par le microenvironnement a été mis en évidence. En effet, plusieurs données suggèrent que les protéines de réponse aux dommages à l'ADN sont influencées par la signalisation émanant des molécules d'adhésion en interaction avec la matrice extracellulaire [392, 393]. Ainsi, dépendamment de la nature de la matrice extracellulaire et des types de dommages à l'ADN, des réponses intégrines-dépendantes impliquant la phosphorylation de membres phares de la RDA, dont CHK1, CHK2 et ATM ont été observées dans différentes lignées cellulaires [392, 393]. Bien que ces observations montrent que l'activation de CHK2 en réponse aux dommages à l'ADN est modulée par la matrice extracellulaire, il n'est pas exclu que des molécules d'adhésion puissent moduler CHK2 au cours du cycle cellulaire en absence de dommages à l'ADN. Ainsi, notre recherche d'une fonction pour CHK2 en mitose pourrait prendre en compte la matrice extracellulaire. Ces expériences, sont conceptuellement intéressantes puisque durant la dernière décennie le microenvironnement tumoral s'est vu attribué un rôle central dans la promotion tumorale et s'est conséquemment imposé comme l'un des aspects centraux de la recherche actuelle sur le cancer [394].

## CONCLUSION

Le caractère éluif des fonctions de CHK2 dans la physiologie cellulaire, incluant son rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN et sa nouvelle fonction proposée dans la mitose, suggèrent que beaucoup reste encore à découvrir en ce qui concerne cette kinase. Dans la dernière décennie, plusieurs études génétiques ont mené à l'identification du gène de CHK2 (CHEK2) comme un gène suppresseur de tumeurs, car la défaillance du gène CHEK2 s'est révélée être un facteur de susceptibilité au cancer dans plusieurs organes [260]. La recherche sur CHK2 revêt d'un intérêt certain puisqu'une meilleure compréhension de cette kinase aux rôles apparemment multiples, mais encore peu compris pourrait permettre une amélioration de la performance des traitements anticancéreux actuellement utilisés en clinique. Une nouvelle stratégie antitumorale impliquant CHK2 qui est actuellement à l'étude est l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de CHK2. L'utilisation de ce type de composés en association avec les agents chimiothérapeutiques génotoxiques pourrait s'avérer particulièrement efficace pour lutter contre des tumeurs qui présentent déjà des défaillances dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Toutefois, pour élaborer de nouvelles stratégies réellement efficaces, une meilleure compréhension du rôle de CHK2 dans le contexte cellulaire tumoral doit être achevée. Le travail présenté dans ce mémoire apporte une nouvelle pierre à l'édifice de la connaissance en confirmant la localisation d'une sous-population de CHK2 aux centrosomes en mitose, un point qui était sujet à débat dans la communauté scientifique.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Matsuoka, S., M. Huang, and S.J. Elledge, *Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase*. Science, 1998. **282**(5395): p. 1893-7.
2. Tsvetkov, L., et al., *Polo-like kinase 1 and Chk2 interact and co-localize to centrosomes and the midbody*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(10): p. 8468-75.
3. Stolz, A. and H. Bastians, *A novel role for Chk2 after DNA damage in mitosis?* Cell cycle, 2010. **9**(1): p. 25-6.
4. d'Adda di Fagagna, F., *Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response*. Nature reviews. Cancer, 2008. **8**(7): p. 512-22.
5. Nagasawa, H., et al., *Some unsolved problems and unresolved issues in radiation cytogenetics: a review and new data on roles of homologous recombination and non-homologous end joining*. Mutation research, 2010. **701**(1): p. 12-22.
6. Venkitaraman, A.R., *Linking the cellular functions of BRCA genes to cancer pathogenesis and treatment*. Annual review of pathology, 2009. **4**: p. 461-87.
7. Bartek, J. and J. Lukas, *Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer*. Cancer cell, 2003. **3**(5): p. 421-9.
8. Kastan, M.B. and J. Bartek, *Cell-cycle checkpoints and cancer*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 316-23.
9. Stracker, T.H., T. Usui, and J.H. Petrini, *Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response*. DNA Repair (Amst), 2009. **8**(9): p. 1047-54.
10. Smith, J., et al., *The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer*. Adv Cancer Res, 2010. **108**: p. 73-112.
11. Turrens, J.F., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. The Journal of physiology, 2003. **552**(Pt 2): p. 335-44.
12. Krishnakumar, R. and W.L. Kraus, *The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets*. Molecular cell, 2010. **39**(1): p. 8-24.
13. Messner, S., et al., *PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails*. Nucleic acids research, 2010. **38**(19): p. 6350-62.

14. Langelier, M.F., et al., *Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1*. Science, 2012. **336**(6082): p. 728-32.
15. Polo, S.E., et al., *Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4*. The EMBO journal, 2010. **29**(18): p. 3130-9.
16. Chou, D.M., et al., *A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(43): p. 18475-80.
17. Facchino, S., et al., *BMII confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2010. **30**(30): p. 10096-111.
18. Smeenk, G., et al., *The NuRD chromatin-remodeling complex regulates signaling and repair of DNA damage*. The Journal of cell biology, 2010. **190**(5): p. 741-9.
19. Ahel, D., et al., *Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1*. Science, 2009. **325**(5945): p. 1240-3.
20. Gottschalk, A.J., et al., *Poly(ADP-ribosylation) directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(33): p. 13770-4.
21. Matsuoka, S., et al., *Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(19): p. 10389-94.
22. Abraham, R.T., *Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases*. Genes & development, 2001. **15**(17): p. 2177-96.
23. Matsuoka, S., et al., *ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1160-6.
24. Linding, R., et al., *Systematic discovery of in vivo phosphorylation networks*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1415-26.
25. Beausoleil, S.A., et al., *Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(33): p. 12130-5.

26. Sancar, A., et al., *Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints*. Annual review of biochemistry, 2004. **73**: p. 39-85.
27. Bakkenist, C.J. and M.B. Kastan, *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation*. Nature, 2003. **421**(6922): p. 499-506.
28. Pellegrini, M., et al., *Autophosphorylation at serine 1987 is dispensable for murine Atm activation in vivo*. Nature, 2006. **443**(7108): p. 222-5.
29. Pandita, T.K., et al., *Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle*. Oncogene, 2000. **19**(11): p. 1386-91.
30. Kurose, A., et al., *Assessment of ATM phosphorylation on Ser-1981 induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors in relation to Ser-139-histone H2AX phosphorylation, cell cycle phase, and apoptosis*. Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology, 2005. **68**(1): p. 1-9.
31. Kozlov, S.V., et al., *Autophosphorylation and ATM activation: additional sites add to the complexity*. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**(11): p. 9107-19.
32. Sun, Y., et al., *A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(37): p. 13182-7.
33. Sun, Y., et al., *DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity*. Molecular and cellular biology, 2007. **27**(24): p. 8502-9.
34. Sun, Y., et al., *Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60*. Nature cell biology, 2009. **11**(11): p. 1376-82.
35. Berkovich, E., R.J. Monnat, Jr., and M.B. Kastan, *Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair*. Nature cell biology, 2007. **9**(6): p. 683-90.
36. You, Z., et al., *Rapid activation of ATM on DNA flanking double-strand breaks*. Nature cell biology, 2007. **9**(11): p. 1311-8.
37. Maser, R.S., et al., *hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks*. Molecular and cellular biology, 1997. **17**(10): p. 6087-96.



38. Mirzoeva, O.K. and J.H. Petrini, *DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex*. Molecular and cellular biology, 2001. **21**(1): p. 281-8.
39. Goldberg, M., et al., *MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint*. Nature, 2003. **421**(6926): p. 952-6.
40. Mochan, T.A., et al., *53BP1 and NFBDI/MDC1-Nbs1 function in parallel interacting pathways activating ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in response to DNA damage*. Cancer research, 2003. **63**(24): p. 8586-91.
41. Huen, M.S. and J. Chen, *The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications*. Cell research, 2008. **18**(1): p. 8-16.
42. Fernandez-Capetillo, O., et al., *H2AX: the histone guardian of the genome*. DNA repair, 2004. **3**(8-9): p. 959-67.
43. Kitagawa, R., et al., *Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway*. Genes & development, 2004. **18**(12): p. 1423-38.
44. Lavin, M.F., *Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2008. **9**(10): p. 759-69.
45. Cook, P.J., et al., *Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions*. Nature, 2009. **458**(7238): p. 591-6.
46. Chapman, J.R. and S.P. Jackson, *Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage*. EMBO reports, 2008. **9**(8): p. 795-801.
47. Melander, F., et al., *Phosphorylation of SDT repeats in the MDC1 N terminus triggers retention of NBS1 at the DNA damage-modified chromatin*. The Journal of cell biology, 2008. **181**(2): p. 213-26.
48. Mailand, N., et al., *RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins*. Cell, 2007. **131**(5): p. 887-900.
49. Huen, M.S., et al., *RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly*. Cell, 2007. **131**(5): p. 901-14.
50. Doil, C., et al., *RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins*. Cell, 2009. **136**(3): p. 435-46.
51. Stewart, G.S., *Solving the RIDDLE of 53BP1 recruitment to sites of damage*. Cell cycle, 2009. **8**(10): p. 1532-8.

52. Chen, L., et al., *ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage*. The EMBO journal, 2005. **24**(19): p. 3411-22.
53. Lavin, M.F. and S. Kozlov, *ATM activation and DNA damage response*. Cell cycle, 2007. **6**(8): p. 931-42.
54. Ahn, J.Y., et al., *Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation*. Cancer research, 2000. **60**(21): p. 5934-6.
55. Lukas, C., et al., *Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage*. Nature cell biology, 2003. **5**(3): p. 255-60.
56. Chehab, N.H., et al., *Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53*. Genes & development, 2000. **14**(3): p. 278-88.
57. Shieh, S.Y., et al., *The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites*. Genes & development, 2000. **14**(3): p. 289-300.
58. Blasina, A., et al., *A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase*. Current biology : CB, 1999. **9**(1): p. 1-10.
59. Chaturvedi, P., et al., *Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway*. Oncogene, 1999. **18**(28): p. 4047-54.
60. Lee, J.S., et al., *hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response*. Nature, 2000. **404**(6774): p. 201-4.
61. Tan, Y., P. Raychaudhuri, and R.H. Costa, *Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes*. Molecular and cellular biology, 2007. **27**(3): p. 1007-16.
62. Stevens, C., L. Smith, and N.B. La Thangue, *Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage*. Nature cell biology, 2003. **5**(5): p. 401-9.
63. Bryant, H.E., et al., *Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 913-7.
64. Dart, D.A., et al., *Recruitment of the cell cycle checkpoint kinase ATR to chromatin during S-phase*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(16): p. 16433-40.
65. Lupardus, P.J., et al., *A requirement for replication in activation of the ATR-dependent DNA damage checkpoint*. Genes & development, 2002. **16**(18): p. 2327-32.

66. Zou, L. and S.J. Elledge, *Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1542-8.
67. Delacroix, S., et al., *The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1*. Genes & development, 2007. **21**(12): p. 1472-7.
68. Kumagai, A., et al., *TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex*. Cell, 2006. **124**(5): p. 943-55.
69. Mordes, D.A., et al., *TopBP1 activates ATR through ATRIP and a PIKK regulatory domain*. Genes & development, 2008. **22**(11): p. 1478-89.
70. Lee, J., A. Kumagai, and W.G. Dunphy, *Claspin, a Chk1-regulatory protein, monitors DNA replication on chromatin independently of RPA, ATR, and Rad17*. Molecular cell, 2003. **11**(2): p. 329-40.
71. Guo, Z., et al., *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 & development, 2000. **14**(21): p. 2745-56.
72. Kondratov, R.V. and M.P. Antoch, *Circadian proteins in the regulation of cell cycle and genotoxic stress responses*. Trends in cell biology, 2007. **17**(7): p. 311-7.
73. Kemp, M.G., et al., *Tipin-replication protein A interaction mediates Chk1 phosphorylation by ATR in response to genotoxic stress*. The Journal of biological chemistry, 2010. **285**(22): p. 16562-71.
74. Kumagai, A. and W.G. Dunphy, *Repeated phosphopeptide motifs in Claspin mediate the regulated binding of Chk1*. Nature cell biology, 2003. **5**(2): p. 161-5.
75. Niida, H., et al., *Specific role of Chk1 phosphorylations in cell survival and checkpoint activation*. Molecular and cellular biology, 2007. **27**(7): p. 2572-81.
76. Walker, M., et al., *Chk1 C-terminal regulatory phosphorylation mediates checkpoint activation by de-repression of Chk1 catalytic activity*. Oncogene, 2009. **28**(24): p. 2314-23.
77. Oe, T., et al., *Cytoplasmic occurrence of the Chk1/Cdc25 pathway and regulation of Chk1 in Xenopus oocytes*. Developmental biology, 2001. **229**(1): p. 250-61.
78. Smits, V.A., P.M. Reaper, and S.P. Jackson, *Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response*. Current biology : CB, 2006. **16**(2): p. 150-9.

79. Falck, J., et al., *The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways*. Nature genetics, 2002. **30**(3): p. 290-4.
80. Lee, J., A. Kumagai, and W.G. Dunphy, *Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins*. Molecular biology of the cell, 2001. **12**(3): p. 551-63.
81. Sorensen, C.S., et al., *The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair*. Nature cell biology, 2005. **7**(2): p. 195-201.
82. Bahassi, E.M., et al., *The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage*. Oncogene, 2008. **27**(28): p. 3977-85.
83. Shimada, M., et al., *Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression*. Cell, 2008. **132**(2): p. 221-32.
84. Zhang, Y.W., et al., *Genotoxic stress targets human Chk1 for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway*. Molecular cell, 2005. **19**(5): p. 607-18.
85. Jiang, K., et al., *Regulation of Chk1 includes chromatin association and 14-3-3 binding following phosphorylation on Ser-345*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(27): p. 25207-17.
86. Kramer, A., et al., *Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase*. Nature cell biology, 2004. **6**(9): p. 884-91.
87. Schmitt, E., et al., *CHK1 phosphorylates CDC25B during the cell cycle in the absence of DNA damage*. Journal of cell science, 2006. **119**(Pt 20): p. 4269-75.
88. Smith, J., et al., *The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer*. Advances in cancer research, 2010. **108**: p. 73-112.
89. Malumbres, M. and M. Barbacid, *To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer*. Nature reviews. Cancer, 2001. **1**(3): p. 222-31.
90. Liskay, R.M., *Absence of a measurable G2 phase in two Chinese hamster cell lines*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**(4): p. 1622-5.
91. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 5th ed2008, New York: Garland Science. xxxi, 1268, [90] p.

92. Masui, Y. and C.L. Markert, *Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes*. The Journal of experimental zoology, 1971. **177**(2): p. 129-45.
93. Smith, L.D. and R.E. Ecker, *The interaction of steroids with Rana pipiens Oocytes in the induction of maturation*. Developmental biology, 1971. **25**(2): p. 232-47.
94. Nurse, P., *Genetic control of cell size at cell division in yeast*. Nature, 1975. **256**(5518): p. 547-51.
95. Hartwell, L.H., J. Culotti, and B. Reid, *Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1970. **66**(2): p. 352-9.
96. Evans, T., et al., *Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division*. Cell, 1983. **33**(2): p. 389-96.
97. Cross, F.R., *DAF1, a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and cellular biology, 1988. **8**(11): p. 4675-84.
98. Hadwiger, J.A., et al., *A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989. **86**(16): p. 6255-9.
99. Nash, R., et al., *The WHI1+ gene of Saccharomyces cerevisiae tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog*. The EMBO journal, 1988. **7**(13): p. 4335-46.
100. Sherr, C.J., *Mammalian G1 cyclins*. Cell, 1993. **73**(6): p. 1059-65.
101. Girard, F., et al., *Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1169-79.
102. Pagano, M., et al., *Cyclin A is required at two points in the human cell cycle*. The EMBO journal, 1992. **11**(3): p. 961-71.
103. Zindy, F., et al., *Cyclin A is required in S phase in normal epithelial cells*. Biochemical and biophysical research communications, 1992. **182**(3): p. 1144-54.
104. Knoblich, J.A., et al., *Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during Drosophila embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation*. Cell, 1994. **77**(1): p. 107-20.

105. Jackson, P.K., et al., *Early events in DNA replication require cyclin E and are blocked by p21CIP1*. The Journal of cell biology, 1995. **130**(4): p. 755-69.
106. Ohtsubo, M., et al., *Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition*. Molecular and cellular biology, 1995. **15**(5): p. 2612-24.
107. Strausfeld, U.P., et al., *Both cyclin A and cyclin E have S-phase promoting (SPF) activity in Xenopus egg extracts*. Journal of cell science, 1996. **109 ( Pt 6)**: p. 1555-63.
108. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 704-7.
109. Hannon, G.J. and D. Beach, *p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest*. Nature, 1994. **371**(6494): p. 257-61.
110. Guan, K.L., et al., *Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function*. Genes & development, 1994. **8**(24): p. 2939-52.
111. Hirai, H., et al., *Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6*. Molecular and cellular biology, 1995. **15**(5): p. 2672-81.
112. Chan, F.K., et al., *Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4*. Molecular and cellular biology, 1995. **15**(5): p. 2682-8.
113. Gu, Y., C.W. Turck, and D.O. Morgan, *Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 707-10.
114. Harper, J.W., et al., *Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21*. Molecular biology of the cell, 1995. **6**(4): p. 387-400.
115. el-Deiry, W.S., et al., *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. Cell, 1993. **75**(4): p. 817-25.
116. Xiong, Y., et al., *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 701-4.
117. Dulic, V., et al., *p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest*. Cell, 1994. **76**(6): p. 1013-23.
118. Noda, A., et al., *Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen*. Experimental cell research, 1994. **211**(1): p. 90-8.

119. Polyak, K., et al., *p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest*. Genes & development, 1994. **8**(1): p. 9-22.
120. Polyak, K., et al., *Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals*. Cell, 1994. **78**(1): p. 59-66.
121. Toyoshima, H. and T. Hunter, *p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21*. Cell, 1994. **78**(1): p. 67-74.
122. Lee, M.H., I. Reynisdottir, and J. Massague, *Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution*. Genes & development, 1995. **9**(6): p. 639-49.
123. Matsuoka, S., et al., *p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene*. Genes & development, 1995. **9**(6): p. 650-62.
124. Chen, J., et al., *Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA*. Nature, 1995. **374**(6520): p. 386-8.
125. Nakanishi, M., et al., *Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21Sdi1/CIP1/WAF1*. The EMBO journal, 1995. **14**(3): p. 555-63.
126. Warbrick, E., et al., *A small peptide inhibitor of DNA replication defines the site of interaction between the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1 and proliferating cell nuclear antigen*. Current biology : CB, 1995. **5**(3): p. 275-82.
127. Lin, J., et al., *Analysis of wild-type and mutant p21WAF-1 gene activities*. Molecular and cellular biology, 1996. **16**(4): p. 1786-93.
128. Russo, A.A., et al., *Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex*. Nature, 1996. **382**(6589): p. 325-31.
129. Cheng, M., et al., *The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts*. The EMBO journal, 1999. **18**(6): p. 1571-83.
130. Dynlacht, B.D., et al., *Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes*. Genes & development, 1994. **8**(15): p. 1772-86.
131. Ziebold, U., et al., *Phosphorylation and activation of B-Myb by cyclin A-Cdk2*. Current biology : CB, 1997. **7**(4): p. 253-60.

132. Saville, M.K. and R.J. Watson, *The cell-cycle regulated transcription factor B-Myb is phosphorylated by cyclin A/Cdk2 at sites that enhance its transactivation properties*. *Oncogene*, 1998. **17**(21): p. 2679-89.
133. Chae, H.D., et al., *Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor is essential for the expression of the cell cycle-regulatory genes and cell cycle G1/S and G2/M transitions*. *Oncogene*, 2004. **23**(23): p. 4084-8.
134. Major, M.L., R. Lepe, and R.H. Costa, *Forkhead box M1B transcriptional activity requires binding of Cdk-cyclin complexes for phosphorylation-dependent recruitment of p300/CBP coactivators*. *Molecular and cellular biology*, 2004. **24**(7): p. 2649-61.
135. Laoukili, J., et al., *Activation of FoxM1 during G2 requires cyclin A/Cdk-dependent relief of autorepression by the FoxM1 N-terminal domain*. *Molecular and cellular biology*, 2008. **28**(9): p. 3076-87.
136. Hagting, A., et al., *MPF localization is controlled by nuclear export*. *The EMBO journal*, 1998. **17**(14): p. 4127-38.
137. Toyoshima, F., et al., *Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint*. *The EMBO journal*, 1998. **17**(10): p. 2728-35.
138. Jackman, M., et al., *Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase*. *Nature cell biology*, 2003. **5**(2): p. 143-8.
139. Li, J., A.N. Meyer, and D.J. Donoghue, *Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997. **94**(2): p. 502-7.
140. Lindqvist, A., et al., *Cyclin B1-Cdk1 activation continues after centrosome separation to control mitotic progression*. *PLoS biology*, 2007. **5**(5): p. e123.
141. McGowan, C.H. and P. Russell, *Cell cycle regulation of human WEE1*. *The EMBO journal*, 1995. **14**(10): p. 2166-75.
142. Baldin, V. and B. Ducommun, *Subcellular localisation of human wee1 kinase is regulated during the cell cycle*. *Journal of cell science*, 1995. **108 ( Pt 6)**: p. 2425-32.
143. Liu, F., et al., *The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex*. *Molecular and cellular biology*, 1997. **17**(2): p. 571-83.



144. Tassan, J.P., et al., *Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase)*. The Journal of cell biology, 1994. **127**(2): p. 467-78.
145. Booher, R.N., P.S. Holman, and A. Fattaey, *Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity*. The Journal of biological chemistry, 1997. **272**(35): p. 22300-6.
146. Nakajima, H., et al., *Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(28): p. 25277-80.
147. O'Farrell, P.H., *Triggering the all-or-nothing switch into mitosis*. Trends in cell biology, 2001. **11**(12): p. 512-9.
148. Dutertre, S., et al., *Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition*. Journal of cell science, 2004. **117**(Pt 12): p. 2523-31.
149. Boutros, R., C. Dozier, and B. Ducommun, *The when and wheres of CDC25 phosphatases*. Current opinion in cell biology, 2006. **18**(2): p. 185-91.
150. Busch, C., et al., *The G2/M checkpoint phosphatase cdc25C is located within centrosomes*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2007. **39**(9): p. 1707-13.
151. Bonnet, J., P. Coopman, and M.C. Morris, *Characterization of centrosomal localization and dynamics of Cdc25C phosphatase in mitosis*. Cell cycle, 2008. **7**(13): p. 1991-8.
152. Gabrielli, B.G., et al., *Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells*. Journal of cell science, 1996. **109 ( Pt 5)**: p. 1081-93.
153. Lammer, C., et al., *The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells*. Journal of cell science, 1998. **111 ( Pt 16)**: p. 2445-53.
154. Karlsson, C., et al., *Cdc25B and Cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis*. The Journal of cell biology, 1999. **146**(3): p. 573-84.
155. Lindqvist, A., et al., *Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome*. The Journal of cell biology, 2005. **171**(1): p. 35-45.

156. Hoffmann, I., et al., *Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis*. The EMBO journal, 1993. **12**(1): p. 53-63.
157. Baldin, V., et al., *Nuclear localization of CDC25B1 and serine 146 integrity are required for induction of mitosis*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(38): p. 35176-82.
158. Mailand, N., et al., *Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability*. The EMBO journal, 2002. **21**(21): p. 5911-20.
159. Watanabe, N., et al., *M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(13): p. 4419-24.
160. Watanabe, N., et al., *Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(33): p. 11663-8.
161. Hanisch, A., et al., *Different Plk1 functions show distinct dependencies on Polo-Box domain-mediated targeting*. Molecular biology of the cell, 2006. **17**(1): p. 448-59.
162. Kang, Y.H., et al., *Self-regulated Plk1 recruitment to kinetochores by the Plk1-PBIP1 interaction is critical for proper chromosome segregation*. Molecular cell, 2006. **24**(3): p. 409-22.
163. Qi, W., Z. Tang, and H. Yu, *Phosphorylation- and polo-box-dependent binding of Plk1 to Bub1 is required for the kinetochore localization of Plk1*. Molecular biology of the cell, 2006. **17**(8): p. 3705-16.
164. Soung, N.K., et al., *Requirement of hCenexin for proper mitotic functions of polo-like kinase I at the centrosomes*. Molecular and cellular biology, 2006. **26**(22): p. 8316-35.
165. Neef, R., et al., *Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1*. Nature cell biology, 2007. **9**(4): p. 436-44.
166. Macurek, L., et al., *Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 119-23.
167. Seki, A., et al., *Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry*. Science, 2008. **320**(5883): p. 1655-8.

168. Walter, A.O., et al., *The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation*. *Oncogene*, 2000. **19**(42): p. 4906-16.
169. Littlepage, L.E., et al., *Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. **99**(24): p. 15440-5.
170. Hutterer, A., et al., *Mitotic activation of the kinase Aurora-A requires its binding partner Bora*. *Developmental cell*, 2006. **11**(2): p. 147-57.
171. Chan, E.H., et al., *Plk1 regulates mitotic Aurora A function through betaTrCP-dependent degradation of hBora*. *Chromosoma*, 2008. **117**(5): p. 457-69.
172. Katayama, H., et al., *Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle*. *The Journal of biological chemistry*, 2001. **276**(49): p. 46219-24.
173. Marumoto, T., et al., *Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells*. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 2002. **7**(11): p. 1173-82.
174. Satinover, D.L., D.L. Brautigan, and P.T. Stukenberg, *Aurora-A kinase and inhibitor-2 regulate the cyclin threshold for mitotic entry in Xenopus early embryonic cell cycles*. *Cell cycle*, 2006. **5**(19): p. 2268-74.
175. Fu, Z., et al., *Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression*. *Nature cell biology*, 2008. **10**(9): p. 1076-82.
176. Laoukili, J., et al., *FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability*. *Nature cell biology*, 2005. **7**(2): p. 126-36.
177. Wang, I.C., et al., *Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase*. *Molecular and cellular biology*, 2005. **25**(24): p. 10875-94.
178. Wierstra, I. and J. Alves, *FOXMI, a typical proliferation-associated transcription factor*. *Biological chemistry*, 2007. **388**(12): p. 1257-74.
179. Donzelli, M. and G.F. Draetta, *Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation*. *EMBO reports*, 2003. **4**(7): p. 671-7.
180. Jin, J., et al., *SCFbeta-TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase*. *Genes & development*, 2003. **17**(24): p. 3062-74.

181. Busino, L., et al., *Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage*. Nature, 2003. **426**(6962): p. 87-91.
182. Sorensen, C.S., et al., *Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A*. Cancer cell, 2003. **3**(3): p. 247-58.
183. Falck, J., et al., *The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis*. Nature, 2001. **410**(6830): p. 842-7.
184. Maya, R., et al., *ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage*. Genes & development, 2001. **15**(9): p. 1067-77.
185. Thornton, T.M. and M. Rincon, *Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival*. International journal of biological sciences, 2009. **5**(1): p. 44-51.
186. Raman, M., et al., *TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage*. The EMBO journal, 2007. **26**(8): p. 2005-14.
187. Perfettini, J.L., et al., *Critical involvement of the ATM-dependent DNA damage response in the apoptotic demise of HIV-1-elicited syncytia*. PloS one, 2008. **3**(6): p. e2458.
188. Faust, D., et al., *p38alpha MAPK is required for contact inhibition*. Oncogene, 2005. **24**(53): p. 7941-5.
189. Bulavin, D.V., et al., *Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway*. Nature genetics, 2004. **36**(4): p. 343-50.
190. Ito, K., et al., *Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells*. Nature medicine, 2006. **12**(4): p. 446-51.
191. Bartek, J., C. Lukas, and J. Lukas, *Checking on DNA damage in S phase*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2004. **5**(10): p. 792-804.
192. Liu, H., et al., *Phosphorylation of MLL by ATR is required for execution of mammalian S-phase checkpoint*. Nature, 2010. **467**(7313): p. 343-6.
193. Liu, H., E.H. Cheng, and J.J. Hsieh, *MLL fusions: pathways to leukemia*. Cancer biology & therapy, 2009. **8**(13): p. 1204-11.
194. Liu, H., E.H. Cheng, and J.J. Hsieh, *Bimodal degradation of MLL by SCFSkp2 and APCCdc20 assures cell cycle execution: a critical regulatory circuit lost in leukemogenic MLL fusions*. Genes & development, 2007. **21**(19): p. 2385-98.

195. Xu, B., et al., *Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation*. *Cancer research*, 2002. **62**(16): p. 4588-91.
196. Taniguchi, T., et al., *Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways*. *Cell*, 2002. **109**(4): p. 459-72.
197. Zeng, Y. and H. Piwnica-Worms, *DNA damage and replication checkpoints in fission yeast require nuclear exclusion of the Cdc25 phosphatase via 14-3-3 binding*. *Molecular and cellular biology*, 1999. **19**(11): p. 7410-9.
198. Taylor, W.R. and G.R. Stark, *Regulation of the G2/M transition by p53*. *Oncogene*, 2001. **20**(15): p. 1803-15.
199. Karlsson-Rosenthal, C. and J.B. Millar, *Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery*. *Trends in cell biology*, 2006. **16**(6): p. 285-92.
200. De Wulf, P. and R. Visintin, *Cdc14B and APC/C tackle DNA damage*. *Cell*, 2008. **134**(2): p. 210-2.
201. Rothblum-Oviatt, C.J., C.E. Ryan, and H. Piwnica-Worms, *14-3-3 binding regulates catalytic activity of human Wee1 kinase*. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 2001. **12**(12): p. 581-9.
202. Chan, G.K., S.T. Liu, and T.J. Yen, *Kinetochore structure and function*. *Trends Cell Biol*, 2005. **15**(11): p. 589-98.
203. Cheeseman, I.M. and A. Desai, *Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(1): p. 33-46.
204. DeLuca, J.G. and A. Musacchio, *Structural organization of the kinetochore-microtubule interface*. *Curr Opin Cell Biol*, 2012. **24**(1): p. 48-56.
205. Musacchio, A. and E.D. Salmon, *The spindle-assembly checkpoint in space and time*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(5): p. 379-93.
206. Kirschner, M. and T. Mitchison, *Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis*. *Cell*, 1986. **45**(3): p. 329-42.
207. Cimini, D. and F. Degraffi, *Aneuploidy: a matter of bad connections*. *Trends in cell biology*, 2005. **15**(8): p. 442-51.

208. Kops, G.J., B.A. Weaver, and D.W. Cleveland, *On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint*. Nature reviews. Cancer, 2005. **5**(10): p. 773-85.
209. Tighe, A., et al., *Aneuploid colon cancer cells have a robust spindle checkpoint*. EMBO reports, 2001. **2**(7): p. 609-14.
210. Maiato, H., et al., *The dynamic kinetochore-microtubule interface*. Journal of cell science, 2004. **117**(Pt 23): p. 5461-77.
211. Cleveland, D.W., Y. Mao, and K.F. Sullivan, *Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling*. Cell, 2003. **112**(4): p. 407-21.
212. Howell, B.J., et al., *Visualization of Mad2 dynamics at kinetochores, along spindle fibers, and at spindle poles in living cells*. The Journal of cell biology, 2000. **150**(6): p. 1233-50.
213. Howell, B.J., et al., *Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells*. Current biology : CB, 2004. **14**(11): p. 953-64.
214. Kallio, M.J., et al., *Rapid microtubule-independent dynamics of Cdc20 at kinetochores and centrosomes in mammalian cells*. The Journal of cell biology, 2002. **158**(5): p. 841-7.
215. Shah, J.V., et al., *Dynamics of centromere and kinetochore proteins; implications for checkpoint signaling and silencing*. Current biology : CB, 2004. **14**(11): p. 942-52.
216. Vink, M., et al., *In vitro FRAP identifies the minimal requirements for Mad2 kinetochore dynamics*. Current biology : CB, 2006. **16**(8): p. 755-66.
217. Kim, S.H., et al., *Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint*. Science, 1998. **279**(5353): p. 1045-7.
218. Peters, J.M., *The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2006. **7**(9): p. 644-56.
219. Uhlmann, F., F. Lottspeich, and K. Nasmyth, *Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1*. Nature, 1999. **400**(6739): p. 37-42.
220. Uhlmann, F., et al., *Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast*. Cell, 2000. **103**(3): p. 375-86.

221. Funabiki, H., K. Kumada, and M. Yanagida, *Fission yeast Cut1 and Cut2 are essential for sister chromatid separation, concentrate along the metaphase spindle and form large complexes*. The EMBO journal, 1996. **15**(23): p. 6617-28.
222. Ciosk, R., et al., *An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast*. Cell, 1998. **93**(6): p. 1067-76.
223. Zou, H., et al., *Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis*. Science, 1999. **285**(5426): p. 418-22.
224. Huang, X., et al., *Securin and separase phosphorylation act redundantly to maintain sister chromatid cohesion in mammalian cells*. Molecular biology of the cell, 2005. **16**(10): p. 4725-32.
225. Holland, A.J. and S.S. Taylor, *Cyclin-B1-mediated inhibition of excess separase is required for timely chromosome disjunction*. Journal of cell science, 2006. **119**(Pt 16): p. 3325-36.
226. Clute, P. and J. Pines, *Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase*. Nature cell biology, 1999. **1**(2): p. 82-7.
227. Hagting, A., et al., *Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1*. The Journal of cell biology, 2002. **157**(7): p. 1125-37.
228. Zirkle, R.E., *Ultraviolet-microbeam irradiation of newt-cell cytoplasm: spindle destruction, false anaphase, and delay of true anaphase*. Radiation research, 1970. **41**(3): p. 516-37.
229. Rieder, C.L. and R.E. Palazzo, *Colcemid and the mitotic cycle*. Journal of cell science, 1992. **102** ( Pt 3): p. 387-92.
230. Bartek, J., J. Lukas, and J. Bartkova, *DNA damage response as an anti-cancer barrier: damage threshold and the concept of 'conditional haploinsufficiency'*. Cell cycle, 2007. **6**(19): p. 2344-7.
231. Gorgoulis, V.G., et al., *Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 907-13.
232. Halazonetis, T.D., *Constitutively active DNA damage checkpoint pathways as the driving force for the high frequency of p53 mutations in human cancer*. DNA repair, 2004. **3**(8-9): p. 1057-62.

233. Hoeijmakers, J.H., *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 366-74.
234. Shiloh, Y., *ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity*. Nature reviews. Cancer, 2003. **3**(3): p. 155-68.
235. Shiloh, Y. and M.B. Kastan, *ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths*. Advances in cancer research, 2001. **83**: p. 209-54.
236. Ahmed, M. and N. Rahman, *ATM and breast cancer susceptibility*. Oncogene, 2006. **25**(43): p. 5906-11.
237. King, M.C., J.H. Marks, and J.B. Mandell, *Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2*. Science, 2003. **302**(5645): p. 643-6.
238. Szymanska-Pasternak, J., et al., *CHEK2 variants predispose to benign, borderline and low-grade invasive ovarian tumors*. Gynecologic oncology, 2006. **102**(3): p. 429-31.
239. Stawinska, M., et al., *Alterations of Chk1 and Chk2 expression in colon cancer*. International journal of colorectal disease, 2008. **23**(12): p. 1243-9.
240. Cybulski, C., et al., *A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk*. Cancer research, 2004. **64**(8): p. 2677-9.
241. Zhou, B.P., et al., *Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells*. Nature cell biology, 2001. **3**(3): p. 245-52.
242. Hanks, S., et al., *Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B*. Nature genetics, 2004. **36**(11): p. 1159-61.
243. Janetka, J.W., et al., *Inhibitors of checkpoint kinases: from discovery to the clinic*. Current opinion in drug discovery & development, 2007. **10**(4): p. 473-86.
244. Sanchez-Perez, I., *DNA repair inhibitors in cancer treatment*. Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico, 2006. **8**(9): p. 642-6.
245. Stracker, T.H., T. Usui, and J.H. Petrini, *Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response*. DNA repair, 2009. **8**(9): p. 1047-54.
246. Liu, Q., et al., *Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint*. Genes & development, 2000. **14**(12): p. 1448-59.



247. Takai, H., et al., *Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice*. Genes & development, 2000. **14**(12): p. 1439-47.
248. Takai, H., et al., *Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription*. The EMBO journal, 2002. **21**(19): p. 5195-205.
249. Tang, J., R.L. Erikson, and X. Liu, *Checkpoint kinase 1 (Chk1) is required for mitotic progression through negative regulation of polo-like kinase 1 (Plk1)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(32): p. 11964-9.
250. Jallepalli, P.V., et al., *The Chk2 tumor suppressor is not required for p53 responses in human cancer cells*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(23): p. 20475-9.
251. Antoni, L., et al., *CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin?* Nature reviews. Cancer, 2007. **7**(12): p. 925-36.
252. Perona, R., et al., *Role of CHK2 in cancer development*. Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico, 2008. **10**(9): p. 538-42.
253. Ingvarsson, S., et al., *Mutation analysis of the CHK2 gene in breast carcinoma and other cancers*. Breast cancer research : BCR, 2002. **4**(3): p. R4.
254. Oldenburg, R.A., et al., *The CHEK2\*1100delC variant acts as a breast cancer risk modifier in non-BRCA1/BRCA2 multiple-case families*. Cancer research, 2003. **63**(23): p. 8153-7.
255. Williams, L.H., et al., *Genetic and epigenetic analysis of CHEK2 in sporadic breast, colon, and ovarian cancers*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2006. **12**(23): p. 6967-72.
256. Zhang, P., et al., *CHK2 kinase expression is down-regulated due to promoter methylation in non-small cell lung cancer*. Molecular cancer, 2004. **3**: p. 14.
257. Meijers-Heijboer, H., et al., *Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(\*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations*. Nature genetics, 2002. **31**(1): p. 55-9.
258. Seppala, E.H., et al., *Germ-line alterations in MSR1 gene and prostate cancer risk*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2003. **9**(14): p. 5252-6.

259. Varley, J. and D.A. Haber, *Familial breast cancer and the hCHK2 1100delC mutation: assessing cancer risk*. Breast cancer research : BCR, 2003. **5**(3): p. 123-5.
260. Cybulski, C., et al., *CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene*. American journal of human genetics, 2004. **75**(6): p. 1131-5.
261. Kilpivaara, O., et al., *CHEK2 I157T associates with familial and sporadic colorectal cancer*. Journal of medical genetics, 2006. **43**(7): p. e34.
262. Ricke, R.M., J.H. van Ree, and J.M. van Deursen, *Whole chromosome instability and cancer: a complex relationship*. Trends in genetics : TIG, 2008. **24**(9): p. 457-66.
263. Stolz, A., et al., *The CHK2-BRCA1 tumour suppressor pathway ensures chromosomal stability in human somatic cells*. Nature cell biology, 2010. **12**(5): p. 492-9.
264. Takada, S., A. Kelkar, and W.E. Theurkauf, *Drosophila checkpoint kinase 2 couples centrosome function and spindle assembly to genomic integrity*. Cell, 2003. **113**(1): p. 87-99.
265. Hong, Y. and P.J. Stambrook, *Restoration of an absent G1 arrest and protection from apoptosis in embryonic stem cells after ionizing radiation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(40): p. 14443-8.
266. Sibon, O.C., et al., *DNA-replication/DNA-damage-dependent centrosome inactivation in Drosophila embryos*. Nature cell biology, 2000. **2**(2): p. 90-5.
267. Golan, A., et al., *Centrosomal Chk2 in DNA damage responses and cell cycle progression*. Cell cycle, 2010. **9**(13): p. 2647-56.
268. Staalesen, V., et al., *Alternative splicing and mutation status of CHEK2 in stage III breast cancer*. Oncogene, 2004. **23**(52): p. 8535-44.
269. Ahn, J., M. Urist, and C. Prives, *The Chk2 protein kinase*. DNA repair, 2004. **3**(8-9): p. 1039-47.
270. Kastan, M.B. and D.S. Lim, *The many substrates and functions of ATM*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2000. **1**(3): p. 179-86.
271. Melchionna, R., et al., *Threonine 68 is required for radiation-induced phosphorylation and activation of Cds1*. Nature cell biology, 2000. **2**(10): p. 762-5.
272. Ahn, J.Y., et al., *Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 protein kinase via the forkhead-associated domain*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(22): p. 19389-95.

273. Kass, E.M., et al., *Stability of checkpoint kinase 2 is regulated via phosphorylation at serine 456*. The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(41): p. 30311-21.
274. Lovly, C.M., et al., *Regulation of Chk2 ubiquitination and signaling through autophosphorylation of serine 379*. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(19): p. 5874-85.
275. Falck, J., et al., *The ATM-Chk2-CDC25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis*. Nature, 2001. **410**: p. 842-847.
276. Peng, C.Y., et al., *Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14.3.3 protein binding by phosphorylation of CDC25C on Serine-216*. Science, 1997. **277**: p. 1501-1505.
277. Hirao, A., et al., *DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2*. Science, 2000. **287**(5459): p. 1824-7.
278. Yang, S., et al., *PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(11): p. 865-70.
279. Stevens, C., L. Smith, and N.B. La Thangue, *Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(5): p. 401-9.
280. Tan, Y., P. Raychaudhuri, and R.H. Costa, *Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(3): p. 1007-16.
281. Blasina, A., et al., *A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase*. Curr Biol, 1999. **9**(1): p. 1-10.
282. Zhang, J., et al., *Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(2): p. 708-18.
283. Zhuang, J., et al., *Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining*. Cancer research, 2006. **66**(3): p. 1401-8.
284. Yang, S., et al., *PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2*. Nature cell biology, 2002. **4**(11): p. 865-70.
285. Shieh, S.Y., et al., *The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites [published erratum appears in Genes Dev 2000 Mar 15;14(6):750]*. Genes & Development, 2000. **14**(3): p. 289-300.

286. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 307-10.
287. Jack, M.T., et al., *Chk2 is dispensable for p53-mediated G1 arrest but is required for a latent p53-mediated apoptotic response*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(15): p. 9825-9.
288. Ahn, J., M. Urist, and C. Prives, *Questioning the role of checkpoint kinase 2 in the p53 DNA damage response*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(23): p. 20480-9.
289. Holland, A.J. and D.W. Cleveland, *Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2009. **10**(7): p. 478-87.
290. Kais, Z. and J.D. Parvin, *Regulation of centrosomes by the BRCA1-dependent ubiquitin ligase*. Cancer biology & therapy, 2008. **7**(10): p. 1540-3.
291. Joukov, V., et al., *The BRCA1/BARD1 heterodimer modulates ran-dependent mitotic spindle assembly*. Cell, 2006. **127**(3): p. 539-52.
292. Moritz, M., et al., *Three-dimensional structural characterization of centrosomes from early Drosophila embryos*. The Journal of cell biology, 1995. **130**(5): p. 1149-59.
293. Moritz, M., et al., *Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome*. Nature, 1995. **378**(6557): p. 638-40.
294. Murphy, S.M., et al., *GCP5 and GCP6: two new members of the human gamma-tubulin complex*. Molecular biology of the cell, 2001. **12**(11): p. 3340-52.
295. Oegema, K., et al., *Characterization of two related Drosophila gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules*. The Journal of cell biology, 1999. **144**(4): p. 721-33.
296. Tassin, A.M., et al., *Characterization of the human homologue of the yeast spc98p and its association with gamma-tubulin*. The Journal of cell biology, 1998. **141**(3): p. 689-701.
297. Fava, F., et al., *Human 76p: A new member of the gamma-tubulin-associated protein family*. The Journal of cell biology, 1999. **147**(4): p. 857-68.

298. Bettencourt-Dias, M. and D.M. Glover, *Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2007. **8**(6): p. 451-63.
299. Doxsey, S.J., *Molecular links between centrosome and midbody*. Molecular cell, 2005. **20**(2): p. 170-2.
300. Kellogg, D.R., M. Moritz, and B.M. Alberts, *The centrosome and cellular organization*. Annual review of biochemistry, 1994. **63**: p. 639-74.
301. Mattison, C.P. and M. Winey, *The centrosome cycle*. Results and problems in cell differentiation, 2006. **42**: p. 111-46.
302. Tsou, M.F. and T. Stearns, *Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle*. Nature, 2006. **442**(7105): p. 947-51.
303. Tsou, M.F. and T. Stearns, *Controlling centrosome number: licenses and blocks*. Current opinion in cell biology, 2006. **18**(1): p. 74-8.
304. Kochanski, R.S. and G.G. Borisy, *Mode of centriole duplication and distribution*. The Journal of cell biology, 1990. **110**(5): p. 1599-605.
305. Hinchcliffe, E.H., et al., *Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in Xenopus egg extracts*. Science, 1999. **283**(5403): p. 851-4.
306. Hinchcliffe, E.H., et al., *Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase*. Science, 2001. **291**(5508): p. 1547-50.
307. Lacey, K.R., P.K. Jackson, and T. Stearns, *Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(6): p. 2817-22.
308. Meraldi, P., et al., *Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A*. Nature cell biology, 1999. **1**(2): p. 88-93.
309. Matsumoto, Y., K. Hayashi, and E. Nishida, *Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells*. Current biology : CB, 1999. **9**(8): p. 429-32.
310. Meraldi, P. and E.A. Nigg, *The centrosome cycle*. FEBS letters, 2002. **521**(1-3): p. 9-13.
311. Palazzo, R.E., et al., *Centrosome maturation*. Current topics in developmental biology, 2000. **49**: p. 449-70.

312. Lange, B.M., et al., *Hsp90 is a core centrosomal component and is required at different stages of the centrosome cycle in Drosophila and vertebrates*. The EMBO journal, 2000. **19**(6): p. 1252-62.
313. Heald, R., et al., *Spindle assembly in Xenopus egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization*. The Journal of cell biology, 1997. **138**(3): p. 615-28.
314. Bornens, M., *Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms*. Current opinion in cell biology, 2002. **14**(1): p. 25-34.
315. Khodjakov, A. and C.L. Rieder, *The sudden recruitment of gamma-tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require microtubules*. The Journal of cell biology, 1999. **146**(3): p. 585-96.
316. Blagden, S.P. and D.M. Glover, *Polar expeditions--provisioning the centrosome for mitosis*. Nature cell biology, 2003. **5**(6): p. 505-11.
317. Lindqvist, A., V. Rodriguez-Bravo, and R.H. Medema, *The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network*. The Journal of cell biology, 2009. **185**(2): p. 193-202.
318. Tibelius, A., et al., *Microcephalin and pericentrin regulate mitotic entry via centrosome-associated Chk1*. The Journal of cell biology, 2009. **185**(7): p. 1149-57.
319. Cazales, M., et al., *CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage*. Cell cycle, 2005. **4**(9): p. 1233-8.
320. Loffler, H., et al., *DNA damage-induced accumulation of centrosomal Chk1 contributes to its checkpoint function*. Cell cycle, 2007. **6**(20): p. 2541-8.
321. Hsu, L.C. and R.L. White, *BRC1 is associated with the centrosome during mitosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(22): p. 12983-8.
322. Ciciarello, M., et al., *p53 displacement from centrosomes and p53-mediated G1 arrest following transient inhibition of the mitotic spindle*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(22): p. 19205-13.
323. Shen, K., et al., *ATM is activated by mitotic stress and suppresses centrosome amplification in primary but not in tumor cells*. Journal of cellular biochemistry, 2006. **99**(5): p. 1267-74.

324. Shinmura, K., et al., *Direct evidence for the role of centrosomally localized p53 in the regulation of centrosome duplication*. *Oncogene*, 2007. **26**(20): p. 2939-44.
325. Zhang, S., P. Hemmerich, and F. Grosse, *Werner syndrome helicase (WRN), nuclear DNA helicase II (NDH II) and histone gammaH2AX are localized to the centrosome*. *Cell biology international*, 2007. **31**(10): p. 1109-21.
326. Oricchio, E., et al., *ATM is activated by default in mitosis, localizes at centrosomes and monitors mitotic spindle integrity*. *Cell cycle*, 2006. **5**(1): p. 88-92.
327. Tritarelli, A., et al., *p53 localization at centrosomes during mitosis and postmitotic checkpoint are ATM-dependent and require serine 15 phosphorylation*. *Molecular biology of the cell*, 2004. **15**(8): p. 3751-7.
328. Tembe, V. and B.R. Henderson, *Protein trafficking in response to DNA damage*. *Cellular signalling*, 2007. **19**(6): p. 1113-20.
329. Doxsey, S., D. McCollum, and W. Theurkauf, *Centrosomes in cellular regulation*. *Annual review of cell and developmental biology*, 2005. **21**: p. 411-34.
330. Doxsey, S., W. Zimmerman, and K. Mikule, *Centrosome control of the cell cycle*. *Trends in cell biology*, 2005. **15**(6): p. 303-11.
331. Khodjakov, A. and C.L. Rieder, *Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression*. *The Journal of cell biology*, 2001. **153**(1): p. 237-42.
332. Matsumoto, T., *[Spindle checkpoint: cell cycle regulation by a signal emitted from kinetochores]*. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme*, 2004. **49**(12): p. 1998-2004.
333. Mikule, K., et al., *Loss of centrosome integrity induces p38-p53-p21-dependent G1-S arrest*. *Nature cell biology*, 2007. **9**(2): p. 160-70.
334. Nigg, E.A., *Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression?* *Nature reviews. Cancer*, 2002. **2**(11): p. 815-25.
335. Duensing, A. and S. Duensing, *Centrosomes, polyploidy and cancer*. *Advances in experimental medicine and biology*, 2010. **676**: p. 93-103.
336. Boveri, T., *The Origin Of Malignant Tumors*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1914.

337. Quintyne, N.J., et al., *Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering*. Science, 2005. **307**(5706): p. 127-9.
338. Basto, R., et al., *Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies*. Cell, 2008. **133**(6): p. 1032-42.
339. Ganem, N.J., S.A. Godinho, and D. Pellman, *A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability*. Nature, 2009. **460**(7252): p. 278-82.
340. Godinho, S.A., M. Kwon, and D. Pellman, *Centrosomes and cancer: how cancer cells divide with too many centrosomes*. Cancer metastasis reviews, 2009. **28**(1-2): p. 85-98.
341. Peddibhotla, S., et al., *The DNA-damage effector checkpoint kinase 1 is essential for chromosome segregation and cytokinesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(13): p. 5159-64.
342. Tang, J., R.L. Erikson, and X. Liu, *Checkpoint kinase 1 (Chk1) is required for mitotic progression through negative regulation of polo-like kinase 1 (Plk1)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(32): p. 11964-9.
343. Wilsker, D., et al., *Essential function of Chk1 can be uncoupled from DNA damage checkpoint and replication control*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(52): p. 20752-7.
344. Kramer, A., et al., *Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(9): p. 884-91.
345. Schmitt, E., et al., *CHK1 phosphorylates CDC25B during the cell cycle in the absence of DNA damage*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 20): p. 4269-75.
346. Tibelius, A., et al., *Microcephalin and pericentrin regulate mitotic entry via centrosome-associated Chk1*. J Cell Biol, 2009. **185**(7): p. 1149-57.
347. Gruber, R., et al., *MCPHI regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1-Cdc25 pathway*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(11): p. 1325-34.
348. Enomoto, M., et al., *Novel positive feedback loop between Cdk1 and Chk1 in the nucleus during G2/M transition*. J Biol Chem, 2009. **284**(49): p. 34223-30.
349. Matsuyama, M., et al., *Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 13): p. 2113-9.



350. Zachos, G., et al., *Chk1 is required for spindle checkpoint function*. Dev Cell, 2007. **12**(2): p. 247-60.
351. Carrassa, L., et al., *U2OS cells lacking Chk1 undergo aberrant mitosis and fail to activate the spindle checkpoint*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(8A): p. 1565-76.
352. Yang, C., et al., *Aurora-B mediated ATM serine 1403 phosphorylation is required for mitotic ATM activation and the spindle checkpoint*. Mol Cell, 2011. **44**(4): p. 597-608.
353. Bihani, T. and P.W. Hinds, *Mitosis hit with an ATM transaction fee: aurora B-mediated activation of ATM during mitosis*. Mol Cell, 2011. **44**(4): p. 513-4.
354. McSherry, T.D., et al., *Non-catalytic function for ATR in the checkpoint response*. Cell cycle, 2007. **6**(16): p. 2019-30.
355. Lee, K.J., et al., *Involvement of DNA-dependent protein kinase in normal cell cycle progression through mitosis*. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**(14): p. 12796-802.
356. Jullien, D., et al., *Kinetochore localisation of the DNA damage response component 53BP1 during mitosis*. Journal of cell science, 2002. **115**(Pt 1): p. 71-9.
357. Plans, V., M. Guerra-Rebollo, and T.M. Thomson, *Regulation of mitotic exit by the RNF8 ubiquitin ligase*. Oncogene, 2008. **27**(10): p. 1355-65.
358. Tuttle, R.L., et al., *Defective in mitotic arrest 1/ring finger 8 is a checkpoint protein that antagonizes the human mitotic exit network*. Molecular cancer research : MCR, 2007. **5**(12): p. 1304-11.
359. Giunta, S., R. Belotserkovskaya, and S.P. Jackson, *DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis*. The Journal of cell biology, 2010. **190**(2): p. 197-207.
360. Townsend, K., et al., *Mediator of DNA damage checkpoint 1 (MDC1) regulates mitotic progression*. The Journal of biological chemistry, 2009. **284**(49): p. 33939-48.
361. Ayoub, N., et al., *The carboxyl terminus of Brca2 links the disassembly of Rad51 complexes to mitotic entry*. Current biology : CB, 2009. **19**(13): p. 1075-85.
362. Wei, J.H., et al., *TTK/hMps1 participates in the regulation of DNA damage checkpoint response by phosphorylating CHK2 on threonine 68*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(9): p. 7748-57.

363. Liu, X. and M. Winey, *The MPS1 Family of Protein Kinases*. Annual review of biochemistry, 2012. **81**: p. 561-85.
364. Yang, C., et al., *The kinetochore protein Bub1 participates in the DNA damage response*. DNA repair, 2012. **11**(2): p. 185-91.
365. Tang, X., et al., *A novel ATM-dependent pathway regulates protein phosphatase 1 in response to DNA damage*. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(8): p. 2559-66.
366. Morrison, C. and C.L. Rieder, *Chromosome damage and progression into and through mitosis in vertebrates*. DNA repair, 2004. **3**(8-9): p. 1133-9.
367. Smith, E., et al., *An ATM- and ATR-dependent checkpoint inactivates spindle assembly by targeting CEP63*. Nature cell biology, 2009. **11**(3): p. 278-85.
368. Brown, N. and V. Costanzo, *An ATM and ATR dependent pathway targeting centrosome dependent spindle assembly*. Cell cycle, 2009. **8**(13): p. 1997-2001.
369. Sanchez, Y., et al., *Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms*. Science, 1999. **286**(5442): p. 1166-71.
370. Smits, V.A., et al., *Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint*. Nature cell biology, 2000. **2**(9): p. 672-6.
371. van Vugt, M.A., et al., *Inhibition of Polo-like kinase-1 by DNA damage occurs in an ATM- or ATR-dependent fashion*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(45): p. 41656-60.
372. Mikhailov, A., R.W. Cole, and C.L. Rieder, *DNA damage during mitosis in human cells delays the metaphase/anaphase transition via the spindle-assembly checkpoint*. Current biology : CB, 2002. **12**(21): p. 1797-806.
373. Sibon, O.C., *Centrosomes as DNA damage regulators*. Nature genetics, 2003. **34**(1): p. 6-7.
374. Gruber, R., et al., *MCPHI regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1-Cdc25 pathway*. Nature cell biology, 2011. **13**(11): p. 1325-34.
375. Enomoto, M., et al., *Novel positive feedback loop between Cdk1 and Chk1 in the nucleus during G2/M transition*. The Journal of biological chemistry, 2009. **284**(49): p. 34223-30.

376. Matsuyama, M., et al., *Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry*. Journal of cell science, 2011. **124**(Pt 13): p. 2113-9.
377. Jallepalli, P.V., et al., *The Chk2 tumor suppressor is not required for p53 responses in human cancer cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(23): p. 20475-9.
378. Carson, F.L. and H. Christa, *Histotechnology: A Self-Instructional Text (3 ed.)*. 2009, American Society for Clinical Pathology Press: Hong Kong.
379. Petronczki, M., P. Lenart, and J.M. Peters, *Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1*. Developmental cell, 2008. **14**(5): p. 646-59.
380. Archambault, V. and D.M. Glover, *Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2009. **10**(4): p. 265-75.
381. Lenart, P., et al., *The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase I*. Current biology : CB, 2007. **17**(4): p. 304-15.
382. Gillingham, A.K. and S. Munro, *The PACT domain, a conserved centrosomal targeting motif in the coiled-coil proteins AKAP450 and pericentrin*. EMBO reports, 2000. **1**(6): p. 524-9.
383. Sankaran, S., et al., *Aurora-A kinase regulates breast cancer associated gene 1 inhibition of centrosome-dependent microtubule nucleation*. Cancer research, 2007. **67**(23): p. 11186-94.
384. Sankaran, S., et al., *BRCA1 regulates gamma-tubulin binding to centrosomes*. Cancer biology & therapy, 2007. **6**(12): p. 1853-7.
385. Sankaran, S., et al., *Centrosomal microtubule nucleation activity is inhibited by BRCA1-dependent ubiquitination*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(19): p. 8656-68.
386. Parvin, J.D., *The BRCA1-dependent ubiquitin ligase, gamma-tubulin, and centrosomes*. Environmental and molecular mutagenesis, 2009. **50**(8): p. 649-53.
387. Vasquez, R.J., et al., *Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro*. Molecular biology of the cell, 1997. **8**(6): p. 973-85.

388. Kapoor, T.M., et al., *Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5*. The Journal of cell biology, 2000. **150**(5): p. 975-88.
389. Cochran, J.C., et al., *Monastrol inhibition of the mitotic kinesin Eg5*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(13): p. 12658-67.
390. Ponten, J. and E. Saksela, *Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 1967. **2**(5): p. 434-47.
391. Morrison, C. and C.L. Rieder, *Chromosome damage and progression into and through mitosis in vertebrates*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 1133-9.
392. De Wever, O., et al., *Priming and potentiation of DNA damage response by fibronectin in human colon cancer cells and tumor-derived myofibroblasts*. International journal of oncology, 2011. **39**(2): p. 393-400.
393. Cordes, N. and C. Beinke, *Fibronectin alters cell survival and intracellular signaling of confluent A549 cultures after irradiation*. Cancer biology & therapy, 2004. **3**(1): p. 47-53.
394. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.