

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Olomouc 2024

Natálie Kočařová



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Analýza jednovláknových DNA mezer po ovlivnění
olaparibem**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Natálie Kočařová
Studijní program:	B0511A030017 Experimentální biologie
Studijní obor:	1501R019 Experimentální biologie
Specializace:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Dávid Lukáč
Termín odevzdání práce:	2024

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Natálie Kočařová
Název práce	Analýza jednovláknových DNA mezer po ovlivnění olaparibem
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Dávid Lukáč
Rok obhajoby práce	2024
Abstrakt	<p>Inhibitory PARP (PARPi) jsou schválené klinické léky pro léčbu nádorových buněk s deficitem BRCA1/2. Nedávný výzkum odhalil nový mechanismus syntetické letality způsobený PARPi u rakoviny s deficitem BRCA1/2. Jako hlavní mechanismus byly identifikovány jednovláknové mezery v DNA.</p> <p>Cílem této bakalářské práce bylo analyzovat, na jakém vlákně DNA olaparib, jako inhibitor PARP, vyvolává vznik jednovláknových mezer. Bylo prokázáno, že olaparib vyvolává vznik jednovláknových DNA mezer na nascentním vlákně DNA bez konformačních změn na templátovém vlákně DNA. Současně bylo zjištěno, že olaparibem indukované jednovláknové DNA mezery, vykazují neobvykle vysoký CldU signál po 16 hodinách. Bylo předpokládáno, že vysoký CldU signál může být výsledkem zpracování jednovláknových DNA mezer do dvouvláknových zlomů během druhé S-fáze buněčného cyklu. Dále bylo prokázáno, že umlčení klíčového rozpoznávacího faktoru dvouvláknových zlomů CtiP pomocí siRNA interference, způsobilo drastický pokles CldU signálu. Navíc, inhibice nukleázy MRE11 pomocí inhibitorů PFM01 a mirin, taktéž snižuje CldU signál. Na druhou stranu umlčení enzymů PRIMPOL a inhibice proteinů spojených se zpracováním Okazaki fragmentů nesnížily signál CldU.</p> <p>V této bakalářské práci byla pozornost zaměřena na analýzu vzniku a následné detekce jednovláknových DNA mezer způsobené olaparibem pomocí imunofluorescenční mikroskopie a siRNA interference. Cílem bylo přinést nové poznatky do dané problematiky.</p>
Klíčová slova	DNA replikace, olaparib, jednovláknové DNA mezery, CldU
Počet stran	57
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Natálie Kočařová
Title of thesis	Analysis of single-stranded DNA gaps after olaparib treatment
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Dávid Lukáč
The year of presentation	2024
Abstract	<p>PARP inhibitors are approved clinical drugs for the treatment of BRCA1/2-deficient cancer cells. In a recent breakthrough, a novel mechanism uncovering PARPi-induced synthetic lethality in BRCA1/2-deficient cancers identified single-stranded DNA gaps as a major mechanism of PARPi-induced synthetic lethality.</p> <p>In this bachelor thesis, we aimed to analyze which DNA strand olaparib, a PARP1 inhibitor, induces ssDNA gaps in. We demonstrate that olaparib induces nascent ssDNA gaps with no conformational changes in the template DNA strand. Additionally, we show that olaparib-induced ssDNA gaps exhibit an unusually high CldU signal after prolonged exposure to olaparib. We suggest that the high CldU signal may result from the processing of ssDNA gaps into double-strand breaks during the second S-phase of the cell cycle. Furthermore, we demonstrate that depletion of the crucial DSB recognition factor CtIP causes a rapid decrease in ssDNA gaps. Moreover, inhibition of MRE11 nuclease activity via PFM01 and mirin also reduces the CldU signal. In contrast, depletion of PRIMPOL and OFP enzymes did not decrease ssDNA gaps. Thus, in this work, we aimed to further investigate the formation of PARPi-induced ssDNA gaps and their subsequent recognition and processing into double-strand breaks using immunofluorescence microscopy and siRNA interference methods.</p>
Keywords	DNA replication, olaparib, ssDNA gaps, CldU
Number of pages	57
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením
Mgr. Dávída Lukáče za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Natálie Kočařová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Mgr. Dávidu Lukáčovi za vedení bakalářské práce, ochotu, trpělivost a čas, který mi věnoval. Dále děkuji celému kolektivu Ústavu molekulární a translační medicíny za možnost zpracování experimentální části bakalářské práce. Tato práce byla podpořena projektem – Projekt Národní ústav pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – financováno Evropskou unií Next Generation EU.

OBSAH

Seznam symbolů a zkratek.....	9
1 Úvod.....	12
2 Cíle práce	13
3 Současný stav řešené problematiky.....	14
3.1 Replikace DNA	14
3.1.1 Historie.....	14
3.1.2 Struktura DNA	14
3.1.3 Replikace DNA u eukaryot	15
3.1.3.1 Zahájení replikace DNA.....	15
3.1.3.2 Průběh replikace DNA	17
3.2 Poly(ADP-ribóza) polymeráza při replikaci DNA	18
3.2.1 Uplatnění PARP1 v opravách poškozené DNA	20
3.2.1.1 Homologní rekombinace	20
3.2.1.2 Nehomologní koncové spojení.....	21
3.2.2 Inhibice PARP1	22
3.2.2.1 Tumor supresorové geny BRCA1 a BRCA2.....	22
3.2.2.2 Syntetická letalita a fenotyp BRCAness	23
3.2.3 PARP1 inhibitory	24
3.2.3.1 Olaparib.....	25
3.3 Jednovláknové DNA mezery	25
3.3.1 Vznik jednovláknových DNA mezer	26
3.3.2 Nové pojetí syntetické letality mezi PARPi a deficitními geny BRCA	27
3.3.3 Jednovláknové DNA mezery jako mediátory syntetické letality	28
4 Experimentální část.....	29
4.1 Kultivace buněčné linie U2OS	30
4.1.1 Ošetření buněk 5'-chloro-2'-deoxyuridinem (CldU) a olaparibem pro zaznačení templátového vlákna DNA a pro stanovení inhibitorů	31

4.1.2	Ošetření buněk 5-chloro-2'-deoxyuridinem (CldU) a olaparibem pro zaznačení nascentního vlákna DNA.....	31
4.2	Imunofluorescence	31
4.2.1	Umlčení polymerázy PRIMPOL a esenciálních proteinů MRE11, EXO1 a CtiP pomocí siRNA interference	32
4.3	Imunofluorescenční mikroskopie	32
5	Výsledky	34
5.1	Analýza jednovláknových DNA mezer na templátovém a nascentním vlákně DNA po ošetření olaparibem	34
5.2	Stanovení možných inhibitorů nukleáz zodpovědných za tvorbu jednovláknových DNA mezer.....	36
5.3	Umlčení esenciálního DSB proteinu CtiP způsobující největší pokles CldU signálu po ovlivnění buněk olaparibem	38
6	Diskuze.....	40
7	Závěr	43
8	Literatura.....	44
9	Seznam obrázků	56

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

AAA⁺ - ATPázové proteiny asociované s variabilní celulární aktivitou (z anglického termínu „ATPases Associated with various cellular Activities“)

ATM – serin/threonin protein kináza (Ataxia Telangiectasia Mutated)

ATR (z anglického termínu „Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein“)

BER – básová excizní oprava (z anglického termínu „Base Excision Repair“)

BLM/WRN – helikáza účastnící se opravné dráhy homologní rekombinace

BRCA1 – tumor supresorový gen 1 (z anglického termínu „Breast Cancer gene 1“)

BRCA2 – tumor supresorový gen 2 (z anglického termínu „Breast Cancer gene 2“)

Cdc6 – kontrolní protein buněčného dělení 6 (z anglického termínu „Cell division control protein 6“)

Cdc45 – kontrolní protein buněčného dělení 45 (z anglického termínu „Cell division control protein 45“)

CDK – cyklin-dependentní kináza (z anglického termínu „Cyclin-Dependent Kinase“)

Cdt1 – faktor licencování chromatinu a replikace DNA (z anglického termínu „Chromatin licensing and DNA replication factor 1“)

CldU – 5-chloro-2'-deoxyuridin

CMG – helikázový komplex proteinů Cdc45-MCM2-7-GINS

CtiP – endonukleáza podílející se na opravě dvouvláknových zlomů DNA pomocí homologní rekombinace (z anglického termínu „CtBP-Interacting Protein“)

DAPI – 4',6-diamino-2-fenylindol

DDK – Dbf4-dependentní kináza (z anglického termínu „Dbf4-Dependent Kinase“)

DMEM – Dulbeccova modifikace Eaglova média (z anglického termínu „Dulbecco Modified Eagle Medium“)

DNA-PKcs – katalytická podjednotka DNA-dependentní serin/threonin kinázy (z anglického termínu „DNA-dependent protein kinase catalytic subunit“)

DNA2 – DNA helikáza/nukleáza 2 (z anglického termínu „DNA helicase/nuclease 2“)

DNA2i – DNA helikáza/nukleáza 2 inhibitor (z anglického termínu „DNA helicase/nuclease 2 inhibitor“)

DSBs – dvouvláknové zlomy (z anglického termínu „double-strand breaks“)

dsDNA – dvouvláknová DNA (z anglického termínu „double-strand DNA“)

EXO1 – exonukleáza 1 (z anglického termínu „Exonuclease 1“)

FANCI (z anglického termínu „Fanconi Anemia Complementation group J“)

FBS – fetální bovinní sérum (z anglického termínu „Fetal Bovine Serum“)

FEN1 – flap endonukleáza 1 (z anglického termínu „flap endonuclease 1“)

FEN1i - flap endonukleáza 1 inhibitor (z anglického termínu „flap endonuclease 1 inhibitor“)

FP – ochrana replikační vidlice (z anglického termínu „Fork Protection“)

GINS – 5-1-2-3 (z japonského termínu „Go-Ichi-Ni-San“)

HLTF (z anglického termínu „Helicase-Like Transcription Factor“)

HPF1 (z anglického termínu „Histone PARylation Factor 1“)

HR – homologní rekombinace (z anglického termínu „Homologous Recombination“)

Ku70/80 – proteinový komplex opravné dráhy NHEJ („Ku autoantigen protein p70, p80“)

LIG1 – DNA ligáza I (z anglického termínu „DNA ligase 1“)

LIG1i – inhibitor DNA ligázy I (z anglického termínu „DNA ligase 1 inhibitor“)

LIG3 – DNA ligáza III (z anglického termínu „DNA ligase 3“)

LOH – ztráta heterozygotnosti (z anglického termínu „Loss Of Heterozygosity“)

MCM2-7 (z anglického termínu „Minichromosome Maintenance proteins 2-7“)

MCM10 (z anglického termínu „Minichromosome Maintenance protein 10“)

MRE11 (z anglického termínu „Meiotic Recombination 11 homolog“)

MRN – proteinový komplex homologní rekombinace (MRE11-Rad50-NBS1 complex)

NBS1 (z anglického termínu „Nijmegen breakage syndrome 1 protein“)

NER – nukleotidová excizní oprava (z anglického termínu „Nucleotide Excision Repair“)

NHEJ – nehomologní koncové spojení (z anglického termínu „Non-Homologous End Joining“)

OFP – zpracování Okazaki fragmentů (z anglického termínu „Okazaki Fragment Processing“)

ORC1-6 – komplex rozpoznávající počátek skládající se z podjednotek 1-6 (z anglického termínu „Origin Recognition Complex 1-6“)

PAR – polymerní řetězce PARP (chains of poly(ADP) ribose)

PARP – Poly(ADP-ribóza) polymeráza (z anglického termínu „Poly(ADP-ribose) polymerase“)

PARPi – inhibitory PARP (z anglického termínu „Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors“)

PBS – fosfátový pufr (z anglického termínu „Phosphate Buffered Saline“)

PCNA (z anglického termínu „Proliferating Cell Nuclear Antigen“)

PFM01 – MRE11 endonukleázový inhibitor

Pre-RC – pre-replikační komplex (z anglického termínu „pre-Replication Complex“)

PRIMPOL – DNA primáza/polymeráza (z anglického termínu „DNA primase/polymerase“)

QIBC – kvantitativní cytometrie založena na obrázku (z anglického termínu „Quantitative Image Based Cytometry“)

RAD51 – RAD51 rekombináza

RECQ1 – ATP-dependentní DNA helikáza Q1 (z anglického termínu „ATP-dependent DNA helicase Q-like 1“)

RFC – replikační faktor C (z anglického termínu „Replication Factor C“)

RNAi – RNA interference

RPA – replikační protein A (z anglického termínu „Replication Protein A“)

siRNA – malá interferující RNA (z anglického termínu „small-interfering RNA“)

SSBs – jednovláknové zlomy (z anglického termínu „single-strand breaks“)

ssDNA – jednovláknová DNA (z anglického termínu „single-strand DNA“)

TRF-2 (z anglického termínu „Telomeric Repeat-binding Factor 2“)

U2OS – epiteliální buňky lidského osteosarkomu (human bone osteosarkoma epithelial cells)

XRCC1 (z anglického termínu „X-ray Repair Cross-Complementing protein 1“)

XRCC4 (z anglického termínu „X-ray Repair Cross-Complementing protein 4“)

1 ÚVOD

Jednou z nejdůležitějších biologických funkcí eukaryotických buněk je replikace DNA, která musí být přísně kontrolována, aby se zabránilo genomové nestabilitě. Pro životaschopnost buňky je nezbytné, aby byla zachována integrita její genetické informace. Buňky jsou však během svého života vystavovány různým vnitřním i vnějším genotoxickým vlivům. Těmito vlivy u buněk dochází k replikačnímu stresu, což je charakteristický znak nádorových buněk (Gaillard et al., 2015; Ubhi & Brown, 2019). Buňky vyvinuly složité mechanismy pro opravu poškození DNA způsobené replikačním stresem. Jedná se zejména o zpomalení nebo zastavení průběhu buněčného cyklu, dokud není DNA zcela opravena. Nedostatečná oprava DNA nebo defekty v reakci na poškození DNA vedou ke genomové nestabilitě, což může vést k potenciálnímu nádorovému bujení (Halazonetis et al., 2008; Mazouzi et al., 2014; Zeman & Cimprich, 2014).

Poly(ADP-ribóza) polymeráza (PARP) je multifunkční, post-translačně modifikační enzym, který se účastní různých biologických procesů, včetně regulace genové exprese, remodelace chromatinu, opravy DNA a apoptózy (Jubin et al., 2016; Fu et al., 2024). Terapeutické cílení na PARP1 pomocí inhibitorů PARP (PARPi) se stalo účinnou strategií při léčbě rakoviny, a to zejména u nádorových buněk s deficitem v homologní rekombinaci (HR) a genech BRCA1/2 (Ragupathi et al., 2023). Tento přístup využívá mechanismu syntetické letality k selektivnímu cílení na nádorové buňky, přičemž zachovává fyziologicky fungující buňky.

Tato bakalářská práce byla zaměřena na analýzu vzniku a následné detekce jednovláknových DNA mezer po ovlivnění buněk olaparibem, inhibitorem PARP. Jednovláknové DNA mezery byly popsány jako alternativní model syntetické letality PARP1 inhibice v BRCA1/2 defektních nádorových buňkách (Cong et al., 2021; Cong & Cantor, 2022).

2 CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše na téma DNA replikace v eukaryotických buňkách, jednovláknové DNA mezery a jejich cytotoxický efekt v nádorových buňkách a důsledky inhibice Poly(ADP-ribózy) polymerázy (PARP) na DNA replikaci
2. Osvojení si metodiky tkáňových kultur a imunofluorescenční mikroskopie
3. Detekce a lokalizace jednovláknových DNA mezer pomocí imunofluorescenční mikroskopie po ovlivnění olaparibem
4. Vyhledávání specifických inhibitorů způsobující pokles tvorby jednovláknových DNA mezer

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Replikace DNA

3.1.1 Historie

Ve druhé polovině 19. století Gregor Mendel ve své průkopnické práci o dědičnosti znaků u rostlin hrachu naznačil, že za přenos vlastností organismu mezi generacemi jsou zodpovědné specifické faktory, dnes označované jako geny (Mendel, 1865). Dříve se předpokládalo, že dědičným materiálem jsou proteiny, avšak Avery, MacLeod a McCarty o sto let později stanovili deoxyribonukleotidovou kyselinu (DNA) jako nositelku genetické informace (Avery et al., 1944). Díky těmto poznatkům byla otevřena cesta k výzkumu, který odhaloval chemickou podstatu DNA, pravidla kódování genetické informace, a nakonec také vedl k návrhu dvoušroubovicové struktury molekuly DNA, na kterém se podíleli Watson a Crick (Watson & Crick, 1953). Právě tento model trojrozměrné struktury DNA následně osvětlil možné mechanismy, jimiž by se genetická informace mohla kopírovat semi-konzervativním způsobem. Tuto hypotézu později experimentálně potvrdili Meselson a Stahl, když ve svém experimentu použili izotopy dusíku, které byly inkorporovány do molekuly DNA pro rozlišení rodičovské DNA od nově syntetizované (Meselson & Stahl, 1958).

Klíčový předpoklad replikace DNA je, že musí probíhat s vysokou účinností přesně jednou za buněčný cyklus. Tím se zabrání hromadění genetických změn s potencionálně škodlivými následky pro přežití buňky a životaschopnost organismu (O'Donnell et al., 2013). Neúplná, chybná nebo nevhavná replikace DNA může vést ke vzniku mutací, chromozomální polyploidii nebo aneuploidii a změn v počtu kopií genů, kde následkem mohou být různá onemocnění včetně rakoviny (Barlow & Nussenzweig, 2014). Veškeré procesy replikace DNA jsou přísně regulovány a také koordinovány s dalšími buněčnými procesy, jako jsou transkripce, translace a oprava DNA. Díky tomu je zajištěna úplná a přesná duplikace celého genomu a správný tok genetické informace (García-Muse & Aguilera, 2016).

3.1.2 Struktura DNA

Určení struktury genetického materiálu, dvoušroubovice DNA, na čemž se v roce 1953 podíleli Watson, Crick, Franklin a Wilkins (Watson & Crick, 1953; Franklin & Gosling, 1953; Wilkins et al., 1953) je všeobecně považováno za klíčový mezník ve vývoji moderních biologických a biomedicinských věd. Jednalo se o první makromolekulární biologickou strukturu určenou na atomární úrovni. Výsledkem byla struktura se specifickými rysy, zejména s antiparalelním pravotočivým uspořádáním dvojité šroubovice, párováním dusíkatých bází adeninu (A) s thyminem (T) a cytosinu (C) s guaninem (G). Toto párování bylo následně experimentálně potvrzeno a označeno za kanonické párování bází podle Watsona a Cricka, dále přesně 10 párů bází na jeden závit

a opakování páru bázi o velikosti 3,4 Å (Arnott et al., 1966). Tyto strukturní rysy odpovídají DNA typu B a bývá tak označována jako B-DNA. Právě B-DNA bývá stále považována za nejreprezentativnější formu pro většinu DNA v lidském genomu (Drew & Dickerson, 1981).

Dříve se předpokládalo, že molekuly DNA se střídají pouze ve dvou přesně definovaných pravotočivých dvoušroubovicových strukturách typu A-DNA a B-DNA. Následné studie však prokázaly, že molekula DNA může mít strukturní polymorfismus, který je důležitý pro její biologickou funkci (Bansal, 1999). Některé z těchto strukturních polymorfismů DNA byly experimentálně pozorovány pomocí rentgenové difrakce, nukleární magnetické rezonance nebo jiných spektroskopických metod, které se neomezují pouze na strukturu Watson-Crickova typu (Ghosh & Bansal, 2003).

3.1.3 Replikace DNA u eukaryot

Replikace DNA je ustálený mechanismus v eukaryotických buňkách (Watson & Crick, 1953). U všech organismů bývá replikace antiparalelních dvouvláknových řetězců prováděna podobným způsobem a označovaná jako semi-diskontinuální. Vlákno syntetizované ve stejném směru pohybu replikační vidlice, tedy ve směru 5'–3', je replikováno kontinuálně a označuje se jako vlákno vedoucí neboli templátové. Zatímco vlákno syntetizované proti směru pohybu replikační vidlice, ve směru 3'–5', je replikováno diskontinuálně a označuje se jako opožďující neboli nascentní. Na opožďujícím se vlákne se během replikace vytvářejí malé fragmenty DNA o velikosti 100-200 nukleotidů. Na počest Reji Okazaki a Tuneko Okazaki, kteří v roce 1968 poprvé navrhli model syntézy těchto fragmentů, bývají označovány jako Okazaki fragmenty (Okazaki et al., 1968).

Replikace DNA se dělí na tři fáze – iniciace, elongace a terminace. Během iniciace se na DNA obousměrně sestavují replizomy. Právě replizomy představují počáteční místa replikace DNA neboli replikační počátky. Elongační fáze se vyznačuje pohybem replizomů v opačném směru, než se pohybuje replikační vidlice. Replizomy zde odvíjejí dvoušroubovici DNA a syntetizují komplementární dceřiná vlákna DNA s využitím obou rodičovských vláken jako templátů. Po dokončení elongační fáze, dochází ke specifickým terminačním procesům, které vedou k rozpadu replizomů a ukončení replikace. Celý proces replikace probíhá pouze v S-fázi buněčného cyklu (Leonard & Mechali, 2013; Creager et al., 2015).

3.1.3.1 Zahájení replikace DNA

Replikace DNA začíná na specifických místech na chromozomu označující se jako replikační počátky. Na tyto počátky se vážou charakteristické iniciační proteiny, čímž se zahájí proces replikace DNA (Stillman, 2005; Kaguni, 2011). U bakterií se často nachází pouze jeden chromozom s jedním replikačním počátkem. Od tohoto počátku replikace jsou sestavovány dvě replikační vidlice, které se pohybují v opačných směrech. Typickým příkladem je replikace kruhového genomu *Escherichia*

coli. Eukaryota se vyznačují tím, že mají více lineárních chromozomů, kde se na každém z nich nachází velký počet replikačních počátků. Více počátků je pro eukaryota nutností, jelikož mají mnohem větší genom než bakterie (Samson & Bell, 2011).

Molekulární struktura replikačních počátků u bakterií je přesně definovaná na rozdíl od těch eukaryotických. Zatímco bakteriální replikační počátky jsou dány specifickou sekvencí nukleotidů, ty eukaryotické (s výjimkou kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*) jsou ovlivněny okolním prostředím a organizací chromatinu (Masai et al., 2010). V lidských buňkách jsou replikační počátky evolučně stálé, což naznačuje, že jejich uspořádání není náhodné. Na chromozomech vytvářejí shluky, které jsou aktivovány v určitou dobu během S-fáze buněčného cyklu (Gilbert et al., 2011).

Bakterie, archea i eukaryota používají k zahájení procesu aktivace proteiny vázající se na počátek replikace. Tyto proteiny jsou složeny z podjednotek proteinů rodiny AAA⁺ (Erzberger & Berger, 2006) a jejich funkce je charakterizována jako multimerní stroje. Eukaryota využívají protein vázající se na replikační počátek, který se skládá ze šesti podjednotek a bývá označen jako ORC1-6 (Stillman, 2005). ORC je složen z pěti podjednotek proteinů příbuzným rodině AAA⁺ a společně s dalším proteinem Cdc6 tvoří hexamer, který se váže na DNA. Protein Cdc6 je příbuzný největší podjednotce ORC – Orc1 (Sun et al., 2012).

Cílem proteinů, které se vážou k replikačnímu počátku, je připojení dvou helikázových podjednotek k DNA. Helikáza je komplexní enzym, skládající se ze šesti podjednotek, který odvíjí molekulu DNA tím, že se váže a obklopuje vlákna rodičovské DNA. Aktivita DNA helikázy dává vzniknout dvěma replikačním vidličkám, které se během replikace pohybují v opačných směrech od každého replikačního počátku. K tomu je však zapotřebí hydrolyza ATP. Buněčné helikázy jsou často podobné hexamerním enzymům přítomných v několika eukaryotických virech jako je například helikáza E1 lidského papilomaviru. Eukaryotní helikáza je heterohexamer označovaný jako MCM2-7 komplex (Enemark & Joshua-Tor, 2008). Tento hexamerní proteinový komplex se váže do replikačního počátku během brzké G₁ fáze buněčného cyklu. K tomu je zapotřebí ORC a jeho kofaktory Cdc6 a Cdt1 (Bell & Dutta, 2002). MCM2-7 se váže na celý duplex DNA ve formě dvojitého hexameru (Ticau et al., 2015). Po navázání helikázy dochází ke vzniku pre-replikačního komplexu (pre-RC), který je složen z ORC, Cdc6, Cdt1 a MCM2-7. Regulace tvorby pre-RC je klíčovým prvkem mechanismů koordinující replikaci DNA s buněčným cyklem (Bell & Dutta, 2002).

Po sestavení tohoto komplexu dochází k jeho aktivaci prostřednictvím cyklin-dependentní kinázy (CDK) a DDK (Muramatsu et al., 2010) a přechodu z G₁ do S-fáze buněčného cyklu. Přeměna dvojitého hexameru helikázy, obklopujícího dvouvláknovou DNA, na dva oddělené hexamery není v současné době zcela známa. Předpokládá se, že závisí na předchozí fosforylaci iniciačních faktorů prostřednictvím proteinkináz CDK a DDK a připojení dalších proteinů jako je Cdc45 a GINS komplexu. Fosforylace těchto faktorů dává za vznik helikázovému komplexu CMG (Ilves et al., 2010).

Aktivní CMG komplex se pohybuje podél obou vedoucích vláken DNA, rozrušuje vodíkové vazby mezi bázemi, čímž rozvíjí molekulu DNA a dává vzniknout replikačním vidlicím. Obě vlákna jsou zároveň pokryta proteinem RPA (Perez-Arnaiz et al., 2016), který udržuje DNA v její rozvinuté jednovláknové formě, a také vytváří prostor pro navázání komplexu DNA primázy a DNA polymerázy alfa (DNA Pol α /primáza) pro syntézu vedoucího i opožděujícího vlákna DNA (Burgers & Kunkel, 2017). DNA Pol α je tvořena čtyřmi různými podjednotkami – PriS, PriL, Pol1 a Pol12 (Muzi-Falconi et al., 2003). Podjednotky PriL a PriS se vyznačují primázovou aktivitou. Katalytická podjednotka Pol1 má polymerázovou aktivitu, nikoliv však exonukleázovou. Chyby, které může během své aktivity způsobit, musí být opravovány jinými enzymy, například prostřednictvím DNA polymerázy delta (Pavlov et al., 2006). Podjednotka Pol12 má funkci regulační (Klinge et al., 2009).

Ve všech dosud studovaných typech buněk nemohou DNA polymerázy syntetizovat nové řetězce de novo. K zahájení elongace replikace DNA je nutná syntéza krátkého RNA primeru o velikosti přibližně 10 nukleotidů. Tuto syntézu katalyzuje enzym DNA primáza (Frick & Richardson, 2001). Po vytvoření krátkého RNA primeru jej DNA Pol α prodlouží a vytvoří krátký úsek DNA o velikosti asi 20 nukleotidů (Clark & Pazdernik, 2013).

3.1.3.2 Průběh replikace DNA

Syntézu nových vláken katalyzují tři replikační DNA polymerázy – DNA polymeráza alfa (DNA Pol α), DNA polymeráza delta (DNA Pol δ) a DNA polymeráza epsilon (DNA Pol ϵ). Jedná se o enzymatické komplexy složené ze čtyř podjednotek patřící do rodiny B-DNA polymeráz. Jejich vlastnosti se však navzájem v mnoha ohledech odlišují (Johansson & Dixon, 2013).

Holoenzym DNA Pol ϵ obsahuje vysokomolekulární katalytickou podjednotku, označovanou Pol2, která se vyznačuje katalytickou i exonukleázovou aktivitou. Další, avšak nekatalytickou esenciální podjednotkou je Dpb2. Neesenciální nekatalytické podjednotky jsou Dpb3 a Dpb4 (Hogg & Johansson, 2012). Účinnost tohoto enzymu je zvyšována prostřednictvím Dpb3, Dpb4 a interakcí s replikační svorkou PCNA. Prostřednictvím PCNA je zvyšována účinnost také DNA Pol δ , díky čemuž mají DNA Pol ϵ i DNA Pol δ srovnatelnou účinnost (Chilkova et al., 2007). Během posledních několika let bylo potvrzeno, že DNA Pol ϵ je primárně zodpovědná za syntézu vedoucího řetězce a DNA Pol δ za syntézu opožděujícího řetězce (Miyabe et al., 2011).

Současný pohled na replikaci DNA u eukaryot, který vychází především ze studií *in vitro* je takový, že jak iniciace replikace vedoucího vlákna DNA, tak diskontinuální syntéza opožděujícího vlákna, vyžadují přepnutí mezi enzymem Pol α na Pol ϵ nebo Pol δ . S tím také souvisí kontinuální recyklace PCNA prostřednictvím enzymatického komplexu RFC (Waga & Stillman, 1994). Bylo prokázáno, že PCNA hraje ústřední roli v koordinaci pořadí událostí během replikace DNA. Nasednutí PCNA pomocí RFC na 3'-OH konec vznikajícího vlákna DNA způsobí vytěsnění DNA Pol α a umožní navázání DNA Pol δ nebo DNA Pol ϵ pro syntézu DNA (Maga et al., 2000).

Bezprostředně poté, co helikáza rozvine dvouřetězcovou DNA a vytvoří replikační vidličku, obklopí RPA jednovláknovou DNA. Vazba RPA chrání jednovláknovou DNA před účinky nukleáz a zároveň zabraňuje tvorbě vlásenkových struktur, které by mohly bránit v postupu replikační vidličky. DNA Pol α /primáza rozpozná oblast pokrytou RPA a zahájí syntézu primerů (Wold, 1997). Asociace RFC s DNA Pol α způsobí přepnutí z iniciační fáze replikace na elongační. Enzymatický komplex RFC váže a otevírá PCNA a umísťuje ji na 3'-OH konec DNA. K tomuto procesu je zapotřebí hydrolyza ATP (Tsurimoto & Stillman, 1991). Následně je Pol α vytěsněna prostřednictvím PCNA, na kterou se váže DNA Pol δ katalyzující syntézu opožďujícího vlákna DNA (Tsurimoto et al., 1990). Právě PCNA je zodpovědná za rychlou aktivitu polymeráz, které jsou schopny rychle polymerizovat tisíce nukleotidů, aniž by se oddělily od genomového templátu (Kuriyan & O'Donnell, 1993). Jelikož vznik Okazaki fragmentů je iniciován vznikem RNA primerů, nemůže dojít k jejich ligaci, dokud není primer odstraněn. Na odstranění primerů se podílí DNA Pol δ v kooperaci s FEN1 a DNA2. Jakmile DNA Pol δ dosáhne 5' konce předchozího Okazaki fragmentu, pokračuje v replikaci opožďujícího vlákna DNA se současným vytěsněním RNA primeru. Vytvoří se přečnivající konec, který rozpozná a odstraní FEN1/DNA2. Předpokládá se ale více možných mechanismů (Bhagwat & Nossal, 2001). Jakmile je RNA primer odstraněn, vzniklé mezery mezi Okazaki fragmenty vyplní DNA Pol δ a propojí DNA ligáza I v souvislé vlákno (Gloor et al., 2010).

Syntéza vedoucího vlákna je katalyzována DNA Pol ϵ . Ta se vyskytuje v komplexu s PCNA a RFC podobně jako DNA Pol δ (Tsurimoto et al., 1990). Po syntéze primeru dochází k připojování deoxyribonukleotidů na 3'-OH konec primeru, a to na základě komplementarity templátového vlákna. Syntéza vedoucího vlákna probíhá ve směru 3'-5', tedy kontinuálně (Snustad & J. Simmons, 2017).

3.2 Poly(ADP-ribóza) polymeráza při replikaci DNA

Poly(ADP-ribóza) polymeráza (PARP) je enzym, který katalyzuje přenos ADP ribózy na cílové proteiny, v procesu známém jako PARylace (Amé et al., 2004). Jedná se o post-translační modifikaci proteinů lineárními nebo rozvětvenými řetězci jednotek ADP ribózy pocházející z NAD^+ . Podílí se na udržování integrity genomu, odpovědi na poškození DNA, opravě DNA a také na replikaci DNA (Alemasova & Lavrik, 2019).

Existuje nejméně 18 známých enzymů rodiny PARP, které jsou kódovány různými geny a sdílejí homologii v katalytické doméně. Nejlépe popsána funkce některých izoform enzymů, jako je například PARP1 a PARP2, je účast v opravných procesech DNA. Bylo však prokázáno, že nejen PARP1 a PARP2, ale i další zástupci rodiny PARP hrají důležitou roli v buněčných procesech včetně buněčné proliferace a buněčné smrti (Amé et al., 2004).

PARP1 je nejlépe popsáný a nejrelevantnější člen rodiny PARP v rámci opravy DNA, který se skládá ze tří hlavních domén. N-terminální doména pro detekci a vazbu poškození DNA, která

obsahuje tři motivy zinkových prstů, auto-modifikační doména a C-terminální katalytická doména. Zinkový prst 2 se vyznačuje největší afinitou k DNA zlomům, zatímco zinkový prst 1 je zodpovědný za aktivaci PARP1, na níž se také podílí zinkový prst 3 (Eustermann et al., 2010). PARP1 bývá aktivován poškozením DNA, zejména zlomy v DNA. Může být však aktivován i narušenou strukturou DNA, interakcí s histony nebo jinými post-translačními modifikacemi (Kamaletdinova et al., 2019). Během PARylace PARP1 štěpí NAD^+ za vzniku nikotinamidu a ADP-ribózy. Vznikající ADP ribóza tvoří linearizované nebo rozvětvené řetězce, označované jako PAR, které slouží jako signální molekuly pro navázání akceptorových proteinů. Tyto proteiny hrají roli v opravě DNA (El-Khamisy, 2003).

Enzym PARP1 je schopný post-translačně modifikovat sám sebe. K automodifikaci dochází v jeho auto-modifikační doméně. V souvislosti s automodifikací PARP1, byl objeven protein HPF1, který je zapojen do interakce s PARP1 během opravy dvouvláknových zlomů (DSBs). V lidských buňkách je HPF1 schopen regulovat auto-modifikační doménu PARP1, čímž podporuje PARylaci histonů, která zajišťuje stabilitu genomu (Gibbs-Seymour et al., 2016). Dále může post-translačně modifikovat i proteiny zapojené do remodelace chromatinu, regulace transkripce či buněčného cyklu, což bývá označováno jako heteromodifikace (Gagné et al., 2008).

Chromozomy eukaryotických buněk se skládají z dlouhé lineární molekuly DNA a z proteinů, které umožňují svinutí vlákna DNA do kompaktnější formy. Komplex DNA a proteinů se označuje jako chromatin. Základními bílkovinnými složkami chromatinu jsou histony. Chromatin existuje ve dvou formách: euchromatin (rozvolněný) a heterochromatin (kondenzovaný). Heterochromatin se dále dělí na fakultativní a konstitutivní.

Právě struktura chromatinu může ovlivnit několik důležitých procesů v buňce. Ovlivňuje například DNA replikaci, transkripci nebo opravu poškozené DNA. Změna struktury neboli remodelace chromatinu umožňuje přístup kondenzované genomové DNA k proteinům regulačního transkripčního aparátu, čímž reguluje genovou expresi. Remodelace chromatinu, na které se podílí rodina enzymů PARP, je tedy nezbytná pro životaschopnost buňky (Morales et al., 2014). Dřívější studie prokázaly, že PARylace vede k celkovému uvolnění struktury chromatinu, což usnadňuje procesy jako je DNA replikace, transkripce či oprava poškozené DNA. Rozvolněná struktura chromatinu také umožňuje, aby se poškozená DNA stala přístupnější pro opravné enzymy (Poirier et al., 1982).

Enzym PARP2 je úzce spojený s PARP1 a vyznačuje se 69% podobností v jejich katalytické doméně (Amé et al., 2004). Rodina enzymů PARP se nachází ve všech eukaryotických buňkách (Jubin et al., 2016) především pak v buněčném jádře, kde hrají klíčovou roli při opravách DNA a zajišťují stabilitu genomu. Aktivita rodiny enzymů PARP byla však objevena i v cytoplazmě (Bai, 2015).

3.2.1 Uplatnění PARP1 v opravách poškozené DNA

Důležitá role PARP1 v opravě DNA byla prokázána zjištěním, že poškození způsobené toxickými látkami, zářením a akumulací toxických lézí na DNA, vede ke zvýšené hladině PARP1 v buňkách (Juarez-Salinas et al., 1979; Skidmore et al., 1979). Enzym PARP1 uplatňuje svoji roli v opravné dráze DNA, označované jako básová excizní oprava (BER), v odpovědi na jednovláčkové zlomy DNA (SSBs). Tyto zlomy jsou rozpoznávány a opravovány proteinovým komplexem, který se skládá z DNA ligázy III (LIG3), DNA polymerázy beta (DNA Pol β) a proteinu XRCC1 (Caldecott et al., 1996). Přestože spolu PARP1 a PARP2 interagují a sdílejí některé společné partnery v opravě SSBs a v opravné dráze BER, PARP2 se vyznačuje kooperací s telomerickým proteinem TRF-2 (Dantzer et al., 2004). Enzym PARP1 je také významný v opravné dráze označované jako nukleotidová excizní oprava, zkráceně NER (Morales et al., 2014).

Opravné dráhy BER a NER zastřešují opravu poškození v DNA, jež mohou být způsobena alkylačními a chemoterapeutickými látkami (Helleday et al., 2008). Chemoterapeutické látky mohou způsobovat různé typy poškození DNA. Jedná se zejména o SSBs, DSBs, chemické modifikace bází, anebo vnitro-řetězcové či mezi-řetězcové křížové vazby. Poškození DNA způsobená chemoterapeutickými látkami vedou ke genové nestabilitě a ke vzniku mutací. Alkylační látky reagují s nukleofilními centry v DNA, což vede ke vzniku modifikovaných bází DNA nebo ke vzniku mezi-řetězcových či vnitro-řetězcových křížových vazeb. Tyto vazby pak blokují replikaci a transkripci, jelikož znemožňují rozdělení dvouvláčkové DNA na dvě jednovláčkové DNA. Příkladem chemoterapeutických a alkylačních látek jsou například hydroxyurea, cisplatina nebo hořčičný dusík (Weber, 2015).

Enzym PARP1 má také významnou roli v opravách dvouvláčkových zlomů, konkrétně v nehomologním koncovém spojení (NHEJ) a homologní rekombinaci (Hochegger et al., 2006).

3.2.1.1 Homologní rekombinace

Homologní rekombinace (HR) je evolučně stálý mechanismus, který opravuje různá poškození DNA, včetně DSBs, mezer v jednom vláčce DNA a mezi-řetězcových křížových vazeb. Mezi těmito lézemi jsou DSBs vysoce toxické, jelikož jediný neopravený DSB může vést k aneuploidii, genetickým aberacím nebo smrti buňky (Pâques & Haber, 1999). Dvouvláčkové zlomy mohou vznikat exogenně, ale i přirozeným způsobem například během replikace (Rothkamm et al., 2003). Zároveň je HR důležitá pro první meiotické dělení, kde přispívá k tvorbě chiasmat, která jsou nezbytná pro správné párování a segregaci homologních chromozomů a ke vzniku genetické diverzity u většiny organismů (Pâques & Haber, 1999).

Homologní rekombinace bývá obvykle označována za bezchybnou opravnou dráhu, jelikož pro syntézu nového řetězce je využívána homologie sesterských chromatid (Talens et al., 2017). V některých případech však může docházet k poruchám této opravné dráhy. Například dědičná forma rakoviny prsu a vaječníku, anebo Fanconiho anémie bývá úzce spojena s defekty v HR (Beernink &

Morrical, 1999) jako je kolaps replikační vidlice nebo například chromozomové přeskupení (Symington et al., 2014).

Mezi hlavní kroky HR je řazena resekce DSBs ve směru 5'-3'. Resekci dvouvláknových zlomů iniciuje nukleázový komplex MRN (komplex MRE11-Rad50-NBS1), který rozpozná DSB a naváže se na jeho volné konce (Lisby et al., 2004). Pomocí helikázy BLM/WRN dojde k rozvinutí DNA, následně pak účinkem nukleázy DNA2/EXO1 dojde k odstranění 5' konce (Mimitou & Symington, 2009). Na obou stranách zlomu se vytvoří 3' koncové přesahy ssDNA. Na jednovláknovou DNA se váže RPA, který se vyznačuje vyšší afinitou a specifitou k ssDNA než rekombináza RAD51 (Li & Heyer, 2008). *In vitro* RPA inhibuje nukleaci vlákna jednovláknové DNA. Tento inhibiční účinek RPA je překonán kofaktory RAD51, které se souhrnně označují jako mediátorové proteiny. Ty vytěsní RPA proteinem RAD51 (Beernink & Morrival, 1999). Jeden z významných mediátorových proteinů je tumor supresorový gen BRCA2, díky kterému protein RAD51 s jednovláknovou DNA začne tvořit nukleoproteinový filament neboli presynaptický komplex (Filippo et al., 2006). Vytvořením presynaptického komplexu se zajistí párování ssDNA s templátovou dsDNA vykazující homologii se ssDNA, a tím i dokončení opravy dvouvláknového zlomu (Li & Heyer, 2008).

Nukleoproteinový filament vstupuje do neporušené sesterské chromatidy a po naleznutí komplementární sekvence vytvoří D-smyčku neboli D-loop. Pro syntézu chybějící části DNA je nutné vytvořit místo pro komplementární sekvence, což je zajištěno odstraněním proteinu RAD51 (Moynahan & Jasin, 2010).

3.2.1.2 Nehomologní koncové spojení

Další významná opravná dráha, která se podílí na opravě DSBs je nehomologní koncové spojení (NHEJ). Tato opravná dráha je aktivní během celého buněčného cyklu, ale hlavní roli hraje během G₁ fáze. V této fázi není přítomný homologní templát, který by mohl být využit pro HR, a proto se přistupuje k NHEJ (Lieber, 2008). Mechanismus NHEJ může být rozdělen do čtyř jednotlivých kroků: rozpoznání konce DNA a sestavení a stabilizace komplexu NHEJ na DSB, přemostění konců DNA, terminální zpracování konců DNA a ligace přerušovaných konců (Davis & Chen, 2013).

Prvním krokem NHEJ je rozpoznání DSB a navázání heterodimeru Ku70-Ku80 k oběma koncům DSB. Bylo prokázáno, že tento heterodimer rekrutuje do místa zlomu buď přímo nebo nepřímo hlavní NHEJ faktory, včetně DNA-PKcs. Ta může fosforylovat proteiny, včetně DNA ligázy IV a XRCC4, které jsou důležité pro následující kroky NHEJ (Costantini et al., 2007).

Další krok je vytvoření dvou tupých konců DNA. V některých případech jsou tupé konce již přítomny, v jiných je potřeba konce upravit. K vytvoření tupých konců se využívá DNA polymeráza, která vyplňuje vzniklou mezeru po vytvoření přesahu ssDNA (Lieber, 2008). Jiným, alternativním řešením je využití nukleázové aktivity komplexu Artemis/DNA-PKcs. Tento komplex štěpí přesahy ssDNA ve směru 5'-3' a vytváří tak tupé konce (Davis & Chen, 2013).

V posledním kroku NHEJ musí dojít k vytvoření komplexu DNA ligáza IV-XRCC4 a k ligaci obou řetězců DNA. Protein XRCC4 je důležitý pro rozpoznání místa zlomu a zacílení DNA ligázy IV, kterou zároveň stabilizuje. Jakmile je DNA ligáza IV zacílena, dojde k ligaci obou řetězců DNA, a tím i k dokončení celého procesu opravy (Pastink et al., 2001).

3.2.2 Inhibice PARP1

Inhibice PARP1 vede ke genomové nestabilitě, akumulaci poškozených buněk a k následnému zastavení buněčného cyklu. To znamená, že PARylace, je v souvislosti s poškozením DNA, nezbytná pro přechod buněk fázemi G₂ a M buněčného cyklu (Jacobson et al., 1985). Enzym PARP1 je klíčovou složkou kontrolního bodu fáze G₂ buněčného cyklu, čímž zabraňuje poškozené buňce se zlomy v DNA vstoupit do mitózy (Schreiber et al., 1995). Inhibice PARP1 má potenciál pro využití v léčbě nádorových onemocnění, a to zejména dvěma mechanismy. Za prvé, zvyšováním citlivosti nádoru na chemoterapeutika, která poškozují DNA a za druhé, indukci syntetické letality u buněk, které jsou vysoce závislé na PARP1 v důsledku defektní homologní rekombinace. Příkladem jsou buňky s mutací v genu BRCA1/2 (Morales et al., 2014).

Mutantní formy genu BRCA1/2 zvyšují riziko vzniku rakoviny. Nejznámější typ rakoviny asociovaný s mutovanými geny BRCA1/2 je u žen rakovina prsu a vaječníku. Tyto mutace mohou u žen také způsobit rakovinu vejcovodů nebo rakovinu primárního peritonea. U mužů jsou mutace v genech BRCA1/2 spojovány s rakovinou prostaty. U obou pohlaví pak s rakovinou pankreatu (Mersch et al., 2015).

3.2.2.1 Tumor supresorové geny BRCA1 a BRCA2

Tumor supresorové geny BRCA1 a BRCA2 jsou geny, jejichž mutované fenotypy predisponují ke vzniku rakoviny prsu a vaječníků. Proteiny kódované těmito geny se podílejí na mnoha důležitých buněčných procesech. Jedná se zejména o opravu poškozené DNA, regulaci transkripce v reakci na poškození DNA a udržování chromozomální stability. Tumor supresorové geny BRCA1/2 také transkripčně regulují jiné geny zapojené do opravy DNA, buněčného cyklu a apoptózy. Mnohé z těchto funkcí jsou zprostředkovány velkým počtem buněčných proteinů, které s geny BRCA interagují (Yoshida & Miki, 2004).

V roce 1990 přinesly genetické studie první důkazy o tom, že riziko vzniku karcinomu prsu je spojeno s chromozomem 17q21 (Hall et al., 1990). Bylo potvrzeno, že se jedná o autozomálně dominantní dědičnost s neúplnou penetrací. U většiny familiárních nádorů prsu a vaječníků byla zjištěna ztráta heterozygotnosti (Loss Of Heterozygosity – LOH), do které jsou zapojeny právě tyto tumor supresorové geny (Smith et al., 1992).

Gen BRCA1, lokalizovaný na chromozomu 17q21, bývá asociován s rakovinou prsu. Je známý pro jeho důležitou roli při opravě DSBs prostřednictvím homologní rekombinace. Buňky s

nedostatkem v genu BRCA1, vykazují defekt v této opravné dráze, a tím i neschopnost opravit poškozené chromozomy (Moynahan et al., 1999). Bylo identifikováno více než 200 zárodečných mutací vedoucí k rakovině prsu (Wooster et al., 1994). Vzhledem k tomu, že pouze u 45 % familiárních případů rakoviny prsu byla prokázána přímá vazba na gen BRCA1, pokračovaly výzkumy k objevení druhého genu asociovaného s rakovinou prsu (Wooster et al., 1995).

V roce 1995 byl identifikovaný gen BRCA2 na chromozomu 13q12.3 (Wooster et al., 1995). Gen BRCA2 interaguje s proteinem RAD51, který se podílí na opravě DNA a zároveň hraje důležitou roli v HR. Právě defekty v HR, které vznikají v důsledku nedostatku klíčových opravných proteinů (příkladem RAD51, RPA), zvyšují závislost buněk na aktivitě PARP1, a tím i citlivost na jeho inhibici (McCabe et al., 2006).

Starší model popisuje, že inhibice PARP1 narušuje opravu SSBs, které se mohou během replikace přeměnit na mnohem toxickejší DSBs. Ty, pokud nejsou opraveny, mohou způsobit buněčnou smrt (Morales et al., 2014). Alternativní model předpokládá, že hlavním mechanismem, který je základem letality buněk, je indukce jednovláknových DNA mezer. V buňkách s deficitem v HR mohou PARP inhibitory (PARPi) vytvářet trvalé ssDNA mezery tím, že inhibují včasné zpomalení replikační vidličky. Inhibitory PARP mohou také narušovat ligaci Okazaki fragmentů inhibicí vyplňování mezer na opožďujícím vlákně. Kombinace přetrvávajících jednovláknových DNA mezer a nespojených Okazaki fragmentů může vést k buněčné letalitě u buněk s deficitem v HR (Thakar & Moldovan, 2021).

Buňky s defekty v genech BRCA1/2 jsou přibližně 133x citlivější na PARP1 než normální buňky, což může být cíleně využito pro inhibici jejich opravných drah vedoucí k syntetické letalitě buněk (Bryant et al., 2005).

3.2.2.2 Syntetická letalita a fenotyp BRCAness

Syntetická letalita je genetická interakce, při níž kombinace dvou genetických událostí vede k buněčné smrti. Je využitelná pro účely molekulárně cílené terapie rakoviny a poskytuje koncepční rámec pro vývoj cytotoxických látek specifických pro rakovinu. Vychází se tedy ze skutečnosti, že buňka s mutací pouze v jednom genu přežívá, avšak současná mutace i ve druhém genu je pro buňku letální. Cílená toxicita PARP inhibitorů vůči nádorovým buňkám s deficitem v HR je významným konceptem v onkologii, jelikož vede k letalitě nádorových buněk (O'Neil et al., 2017).

Velký potenciál v léčbě rakoviny na bázi syntetické letality mají nádorové supresory BRCA1/2 a proteiny podílející se na opravě DNA. Mutantní geny BRCA1/2 vykazují syntetickou letalitu s opravným enzymem PARP1. U pacientů s těmito mutacemi je tedy možnost léčit nádorová onemocnění prostřednictvím PARPi (Farmer et al., 2005). Inhibitory PARP jsou první klinicky schválené léky využívající syntetické letality (O'Neil et al., 2017).

Dalším příkladem syntetické letality je interakce genu ATM a proteinu p53. ATM hraje důležitou roli v buněčné odpovědi na poškození DNA. U buněk, které postrádají funkční protein p53, stačí pouze inaktivace ATM k tomu, aby byly citlivé na genotoxickou terapii (Jiang et al., 2009).

Byly taktéž zjištěny údaje o účinnosti PARPi u dalších zárodečných BRCA mutovaných malignit, včetně karcinomů prostaty a slinivky břišní (Kaufman et al., 2015). Otázkou však zůstalo, zda je možné tuto účinnost rozšířit i na další typy nádorů s deficitem opravy DNA bez zárodečných mutací BRCA1/2. Byl tak popsán fenotyp, spojovaný se sporadickými karcinomy, který je označován jako fenotyp “BRCAness“. Termínem BRCAness se označují malignity, které nevznikly na základě zárodečných mutací genů BRCA1 nebo BRCA2, ale přesto sdílejí fenotypové a molekulární rysy v poškozené HR. Patří sem somatická mutace v genech BRCA1/2, hypermetylace promotoru BRCA1 nebo mutace v jiných genech zapojených do oprav DSBs (Lord & Ashworth, 2016). Tyto malignity sdílí stejnou terapeutickou zranitelnost jako nádory spojené s BRCA, včetně citlivosti na chemoterapii platinou (Timms et al., 2014).

3.2.3 PARP1 inhibitory

Inhibice opravy DNA v nádorových buňkách představuje v současné době atraktivní strategii pro zesílení cytotoxických účinků chemoterapie, a proto se stala předmětem vědeckých studií. Nejdál ve vývoji jsou ze známých inhibitorů opravy poškozené DNA, inhibitory PARP (PARPi). Tyto inhibitory se zdají být slibnou cestou pro léčbu různých typů rakoviny, včetně rakoviny prsu a vaječnicků (Javle & Curtin, 2011).

Inhibitory PARP jsou typem cílených protinádorových léků, které blokuji mechanismus opravy DNA prostřednictvím PARP1 nebo PARP2. Inhibitory PARP brání v opravě poškozené DNA v nádorových buňkách, čímž pomáhají tyto buňky ničit (Turk & Wisinski, 2018). Bylo popsáno několik selektivních a účinných inhibitorů rodiny enzymů PARP, z nichž všechny jsou analogy nikotinamidu (Curtin & Szabo, 2013). V současné době existuje pět nejznámější inhibitorů rodiny enzymů PARP – jsou to olaparib, rucaparib, niraparib, talazoparib a veliparib. Zatím se zdá, že PARPi jsou nadějnou chemoterapií pro osoby s dědičnou mutací v genu BRCA1/2 (Turk & Wisinski, 2018).

Inhibitory PARP mají několik známých mechanismů účinku. Příkladem je inhibice báze excizní opravy nebo jejich schopnost zachycovat enzymy rodiny PARP (tzv. PARP trapping) na vlákne DNA. Tyto mechanismy vedou k indukci DSBs ihned po zastavení a následném kolapsu replikační vidličky. Zdá se, že nádory, u nichž je zjevný defekt v HR, a tedy i v opravě DSBs, jsou citlivé na PARPi (Kaufman et al., 2015).

Dříve se předpokládalo, že PARPi způsobují výhradně inhibici katalytické aktivity PARP1 a PARP2. Bylo však prokázáno, že katalytická inhibice není jediný mechanismus, kterým PARPi působí cytotoxicky. Vybrané PARPi mohou zachycovat PARP1/PARP2 na poškozené DNA – tzv. PARP trapping (Murai et al., 2012). Vzniklé komplexy PARP-DNA zachycené na poškozené DNA jsou pro buňku mnohem toxičtější než samotná katalytická inhibice. Ne všechny PARPi mají

ekvivalentní aktivitu PARP trappingu. Ve skutečnosti se v klinické fázi jejich schopnost zachycovat enzymy rodiny PARP mezi několika PARPi významně liší (Shen et al., 2015). Z pěti testovaných PARPi byl veliparib určen především jako katalytický inhibitor s nízkou aktivitou PARP trappingu. Olaparib, niraparib a rucaparib jsou schopny zachycovat enzymy rodiny PARP přibližně stokrát účinněji než veliparib. Největší účinností se vyznačuje talazoparib, který byl ve spojitosti s PARP trappingem nejvíce studován (Murai et al., 2012).

Inhibice katalytické aktivity vede současně k inhibici auto-PARylace, což brání PARP1 disociovat od DNA. Vznikají tak komplexy PARP-DNA, které zůstávají uvězněné na poškozené DNA. Zabraňuje se tak opravě SSBs a jejich hromadění v buňce může vést ke vzniku DSBs a následně k buněčné smrti (Helleday, 2011).

3.2.3.1 Olaparib

Olaparib se využívá zejména k léčbě ovariálního karcinomu. Jeho funkce spočívá v inhibici enzymů rodiny PARP, čímž následně blokuje opravu SSBs. Následkem je syntetická letalita nádorových buněk asociovaných s genem BRCA1/2, u kterých je narušena HR (Goulooze et al., 2016).

Rakovina vaječníků je pátým nejčastějším nádorovým onemocněním u žen v Evropě (Goulooze et al., 2016). Včasná diagnóza bývá velmi vzácná a následná chemoterapie bývá účinná jen krátkodobě. Zárodečná mutace v genu BRCA1/2 se vyskytuje přibližně u 20 % případů serózního karcinomu ovarií (Clamp & Jayson, 2015). Olaparib bývá indikován u dospělých pacientek se serózním epiteliálním karcinomem vaječníků, vejcovodů a primárním karcinomem peritonea (Goulooze et al., 2016).

Evropská léková agentura (EMA) schválila tento lék k udržovací léčbě nádorů vzniklých v souvislosti s mutací v genu BRCA1/2 a zároveň, které bývají citlivé k platině (Goulooze et al., 2016). U buněk, které získávají rezistenci vůči chemoterapeutickým látkám, jako je například právě platina, se často vyskytuje zvýšená schopnost opravy DNA. Studie *in vitro* ukazují, že buňky rezistentní k cis-platině, vykazují zvýšenou schopnost opravovat poškození způsobená cis-platinou (Parker et al., 1991). Cis-platina, karboplatina a oxaliplatin se staly třemi nejčastěji předepisovanými chemoterapeutiky používanými k léčbě solidních nádorů (Rosenberg et al., 1969). Rezistence na platinu, ať už vlastní či získaná během cyklické léčby, je závažným klinickým problémem. V současné době totiž neexistují další látky, které by bylo možné přidat k léčbě, abychom se rezistenci vyhnuli (Helleday et al., 2008).

3.3 Jednovláknové DNA mezery

Obvykle se citlivost na PARPi připisuje tomu, že buňky s deficitem v genech BRCA nejsou schopny zabránit vzniku dvouvláknových zlomů a opravit je. Tento předpoklad vychází z funkce genů BRCA při opravě DSBs homologní rekombinací (Cong & Cantor, 2022). Zároveň se očekává, že proteiny

BRCA podporují ochranu replikační vidlice (fork protection - FP), a tím omezují kolaps a nadměrnou nukleolytickou degradaci zastavené replikační vidlice. V případě jejich nepřítomnosti se předpokládá, že se zastavená vidlice zhroutí do DSBs (Schlacher et al., 2012). Defekty v homologní rekombinaci, FP nebo fenotyp BRCAness jsou tak vodítkem pro klinické využití PARPi (Cong & Cantor, 2022). Bylo však zjištěno, že olaparib, jako inhibitor rodiny enzymů PARP, nezpomaluje ani neblokuje replikaci DNA, ale naopak ji urychluje (Maya-Mendoza et al., 2018). Enzym PARP1 se tak podílí na tom, že umožňuje reverzi replikační vidličky, čímž se vidličky zpomalují, pozastavují či mění směr, když čelí replikačním překážkám (Berti et al., 2013). Dnes se však navrhuje již odlišný model, ve kterém toxicita PARPi vychází ze vzniku jednovláknových DNA mezer během replikace DNA. Jednovláknové DNA mezery se na rozdíl od DSBs tvoří bezprostředně po terapii PARPi, bývají výrazně zhoršeny v buňkách s deficitem BRCA1/2, a také bývají potlačeny při rezistenci na PARPi (Cong & Cantor, 2022).

Společnou zranitelností nádorových buněk citlivých na PARPi je právě aberantní tvorba jednovláknových DNA mezer během replikace DNA (Wong et al., 2021). Defekty v potlačení vzniku mezer odpovídají přesněji na citlivost terapie než DSBs (Panzarino et al., 2021) a zároveň více odpovídají na PARPi (Cong et al., 2021). Na omezení vzniku mezer se podílí dráha BRCA-RAD51 (Panzarino et al., 2021). Zdroj jednovláknových DNA mezer je spojován jak s defekty v syntéze opožďujícího vlákna, tak v repriming reakcích probíhajících na vedoucím vlákně (Cantor, 2021). Předpokládá se, že nádory s mutacemi v genech BRCA1/2, které sdílejí fenotyp BRCAness, jsou senzitivní vůči genotoxickým terapiím prostřednictvím PARPi a indukují tak vznik jednovláknových DNA mezer. Zároveň se očekává, že mezery jsou relevantní pro řadu synteticky letálních či toxických interakcí (Cong & Cantor, 2022).

3.3.1 Vznik jednovláknových DNA mezer

Při neúplném kanonickém zpracování Okazaki fragmentů (OFP), a tedy pokud v opožďujícím řetězci zůstávají jednovláknové mezery, dochází k aktivaci enzymu PARP1. Auto-PARylace PARP1 rekrutuje protein XRCC1, který interaguje s DNA ligázou III (LIG3) a DNA Pol β , aby zpracoval a vyplnil mezery v mechanismu označovaném jako rezervní zpracování Okazaki fragmentů. Tento proces je zásadním krokem pro dokončení syntézy opožďujícího vlákna ve zdravých buňkách (Hanzlikova et al., 2018). Rezervní zpracování Okazaki fragmentů vyžaduje dráhu BRCA-RAD51. V buňkách s deficitem v BRCA1 je aktivace PARP1 na opožďujícím vlákně abnormálně zvýšená. Hyper-aktivovaný enzym PARP1 však nedokáže účinně rekrutovat XRCC1 a LIG3. Vzhledem k tomuto defektu, vykazují buňky s deficitem BRCA1 větší závislost na kanonické syntéze opožďujícího řetězce a zároveň mají zvýšenou citlivost na ztrátu kanonické FEN1 (Cong et al., 2021). Ztráta FEN1 je synteticky letální v buňkách s deficitem BRCA-Fanconiho anémie, a proto jsou mezery vzniklé na opožďujícím vlákně příčinou jejich toxicity (Guo et al., 2020). Předpokládá se, že PARPi naruší OFP a vytvoří tak mezery na opožďujícím vlákně (van Wietmarschen &

Nussenzweig, 2018). Inhibitory PARP brání vzniku nascentních vláken během replikace DNA (Vaitsiankova et al., 2022), a proto je syntéza opoždujících vláken jako základ cytotoxicity PARPi, zranitelností pro buňky s deficitem v genech BRCA (Cong & Cantor, 2022).

Zdroj jednovláknových DNA mezer v buňkách s deficitem v genech BRCA je také spojován s repriming reakcemi na vedoucím vlákně prostřednictvím komplexu DNA primázy/polymerázy neboli PRIMPOL (Kang et al., 2021). Reverze replikační vidlice je proces, ke kterému dochází, pokud je replikační vidlice vystavená genotoxickému stresu. Tento ochranný mechanismus umožňuje vidlici změnit směr a vytvořit strukturu podobnou Hollidayově spoji, který podporuje opravu poškození DNA během replikace (Neelsen & Lopes, 2015). Pokud je ohrožena reverze replikační vidlice, komplex PRIMPOL umožní replikaci kolem vzniklých bariér. Repriming reakce spojená s komplexem PRIMPOL probíhá během terapie prostřednictvím PARPi. Bez PARylovaného PARP1 je reverze vidličky potlačena proteinem RECQ1 (Zellweger et al., 2015). Tento protein je zapojen do mnoha buněčných procesů včetně opravy DNA, buněčného cyklu a transkripce (Debnath & Sharma, 2020). Podobně ztráta proteinu HLTF snižuje reverzi vidliček (Bai et al., 2020). Repriming reakce jsou také spojeny s defekty v OFP. Předpokládá se, že mezery vyvolané defektním reprimingem se mohou vytvořit jak na vedoucím, tak opoždujícím vlákně (Cong & Cantor, 2022).

3.3.2 Nové pojetí syntetické letality mezi PARPi a deficitními geny BRCA

Analýza jednovláknových DNA mezer bezprostředně po terapii PARPi odhalila zásadní rozdíly mezi citlivými a rezistentními liniemi buněk. U rezistentních BRCA-kontrolních buněk vznikaly jednovláknové DNA mezery jen omezeně, zatímco u citlivých BRCA-deficientních buněk vznikaly exponenciálně (Cong et al., 2021). Mezery byly naopak potlačeny v řadě genetických a získaných modelů, u nichž se předpokládalo, že rezistence k PARPi pochází z obnovené HR nebo FP. Rezistence k PARPi byla pozorována u buněk s deficitem v HR a FP. Jednalo se zejména o buňky FANCI (Fanconi Anemia Complementation group J), které nebyly citlivé k PARPi navzdory defektům v HR a FP a zároveň nedocházelo k indukci jednovláknových DNA mezer (Maya-Mendoza et al., 2018).

Jednovláknové DNA mezery vznikají po ošetření PARPi mnohem rychleji než DSBs. Tato latence by mohla odrážet skutečnost, že neopravené jednovláknové zlomy v DNA nebo komplexy PARP-DNA blokují replikaci DNA a indukují tak vznik DSBs (Maya-Mendoza et al., 2018). Ačkoliv mohou být mezery zdrojem DSBs v následné S-fázi buněčného cyklu (Simoneau et al., 2021), existují i jiné potenciální zdroje pro jejich tvorbu. Inhibitory PARP také indukují apoptózu, jakožto proces buněčné smrti využívající enzymy, které přerušují DNA. Inhibice apoptózy snižuje tvorbu DSBs, což naznačuje, že zlomy mohou pocházet z velké části z apoptózy (Cong et al., 2021). Mezery také nemusí být příčinou zastavených replikačních vidlic. Vyskytují se jako samostatné entity a degradují se či rozšiřují za odlišných podmínek (Somyajit et al., 2021).

3.3.3 Jednovláknové DNA mezery jako mediátory syntetické letality

Toxicita jednovláknových DNA mezer po terapii PARPi nebo jiných látkách bude pravděpodobně vyšší u buněk s deficitem v genech BRCA1/2. Například proti repriming reakcím působí BRCA2 spolu s proteinem MCM10, který je součástí replizomu (Kang et al., 2021). Geny BRCA1/2 však omezují prodlužování mezer nukleázou MRE11 či jinými nukleázami a zapojují se do post-replikačních mechanismů oprav jednovláknových DNA mezer spolu s PARP1 (Quinet et al., 2020).

Inhibitory PARP senzibilují nejen buňky s deficitem, mutací nebo poruchou kanonických faktorů OFP, včetně exonukleázy 1 (EXO1), DNA helikázy/nukleázy 2 (DNA2), LIG1 nebo PCNA, ale také buňky s deficitem rezervních faktorů OFP jako je XRCC1, LIG3 a DNA Pol β (Hewitt et al., 2021). Inhibitory PARP jsou také senzitivní pro buňky se ztrátou enzymu RNázy H2, který je schopný odstraňovat RNA primery, jež vznikají během syntézy opoždujícího vlákna. Schopnost odstraňovat RNA primery, a tedy funkce RNázy H2, je kritickým procesem pro zrání Okazaki fragmentů (Zimmermann et al., 2018). Zároveň jsou PARPi synteticky letální při ztrátě HPF1, který moduluje katalytickou aktivitu PARP1 a podporuje proces rezervního OFP (Hewitt et al., 2021). Bylo také zjištěno, že LIG3, DNA Pol β a HPF1 zvyšují citlivost PARPi (Fugger et al., 2021). Lze předpokládat, že jednovláknové DNA mezery poskytují řadu dalších synteticky letálních interakcí, čímž se stávají vysoce toxickými (Ali et al., 2021).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Biologický materiál:

Adherentní buněčná linie lidského osteosarkomu U2OS (HTB-96, ATCC, USA)

Chemikálie:

0,2% Triton X-100 (ROTH, Německo)

0,5% Triton X-100 (ROTH, Německo)

1% směs antibiotik penicilin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific, USA)

4% formaldehyd (Sigma Aldrich, USA)

Chlorid sodný (Sigma Aldrich, USA)

Chlorid draselný (Sigma Aldrich, USA)

CldU (Abcam, UK)

DAPI (Sigma Aldrich, USA)

Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Sigma Aldrich, USA)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma Aldrich, USA)

DNA2 inhibitor (Sigma Aldrich, USA)

FEN1 inhibitor (Sigma Aldrich, USA)

LIG1 inhibitor (Sigma Aldrich, USA)

Lipofektamin (Thermo Fisher Scientific, USA)

Médium DMEM (Biosera, Francie)

Médium FBS 10270 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Mirin (Sigma Aldrich, USA)

VECTASHIELD® Mounting Medium (Vector Laboratories, USA)

Olaparib (Selleckchem, USA)

PFM01 (Selleckchem, USA)

Primární protilátka anti-CldU (Abcam, UK)

Sekundární protilátka Alexa Fluor 568 anti-rat (Abcam, UK)

siRNA (OriGene, USA)

Trypsin (Thermo Fisher Scientific, USA)

Přístrojové vybavení:

Laminární box Scanlaf Mars Safety Classe 2 (LaboGene, Dánsko)

Pipetor (Gilson, USA)

Růstový inkubátor (Thermo Fisher Scientific, USA)

Skenovací mikroskop Olympus ScanR (Olympus, Japonsko)

Stolní centrifuga (Sigma Aldrich, USA)

Světelný mikroskop (Zeiss, Německo)

Třepačka Vortex (IKA, Německo)

ViCell (Beckman Coulter, USA)

Příslušenství a pomůcky:

15 ml plastové falkony (Sigma Aldrich, USA)

1,5 ml plastové mikrozkušavky (Eppendorf, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Kultivační sklíčka o průměru 12 mm (Thermo Fisher Scientific, USA)

Parafilm (Thermo Fisher Scientific, USA)

Plastové kultivační lahve 75 cm² (TPP, Švýcarsko)

Plastové kultivační misky 75 cm² (TPP, Švýcarsko)

Plastové pipety (Thermo Fisher Scientific, USA)

Software:

GraphPad Prism 8 (USA)

ScanR Analysis software (Olympus, Japonsko)

4.1 Kultivace buněčné linie U2OS

Pro experiment byla využita adherentní buněčná linie lidského osteosarkomu U2OS. Buňky byly kultivovány v živném médiu DMEM obsahující 10% FBS sérum a 1% směs antibiotik penicilin/streptomycin v kultivačních lahvích o ploše 75 cm² v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5 % oxidu uhličitého. Buňky byly pasážovány třikrát týdně. Proces pasážování probíhal odsátím živného média pomocí vakuové pumpy s následným ošetřením buněk roztokem trypsinu (tzv. trypsinizace) o objemu 500 µl pro jejich uvolnění ze dna plastové kultivační nádoby. Trypsinizace probíhala po dobu 5 minut v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5 % oxidu uhličitého. Následně bylo přidáno 5 ml čerstvého živného média DMEM (10% FBS sérum; 1% směs antibiotik penicilin/streptomycin). Buněčná suspenze byla přepipetována do 15ml plastové falkony. Do speciální kyvety bylo odebráno 550 µl dobře promíchané buněčné suspenze pro změření koncentrace buněk přístrojem ViCell.

Po změření koncentrace byly buňky vysazeny na sklíčka o průměru 12 mm do kultivační misky o ploše 75 cm². Koncentrace činila 200 000 buněk na 5 ml živného média z důvodu získání 90 % konfluence buněk v den přípravy vzorku na fluorescenční mikroskopii a z důvodu inkubace po dobu 48 hodin s 5-chloro-2'-deoxyuridinem (CldU).

Veškeré chemikálie, které byly používány pro práci s živými buňkami, byly vždy před prací ohřáté na 37 °C ve vodní lázni. Práce probíhala za sterilních podmínek v laminárním boxu.

4.1.1 Ošetření buněk 5'-chloro-2'-deoxyuridinem (CldU) a olaparibem pro zaznačení templátového vlákna DNA a pro stanovení inhibitorů

Po vysazení byla k buňkám přidána pseudobáze CldU v koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Buňky byly kultivovány po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C a s 5 % oxidu uhličitého v inkubátoru. Po 48 hodinách byla sklička s buňkami přenesena do čerstvého živného média DMEM. Následně byla ošetřena inhibitory: olaparib (10 $\mu\text{mol/l}$), mirin (50 $\mu\text{mol/l}$), PFM01 (50 $\mu\text{mol/l}$), DNA2i (10 $\mu\text{mol/l}$), LIG1i (10 $\mu\text{mol/l}$), FEN1i (10 $\mu\text{mol/l}$) a kultivována po dobu 16 hodin přes noc při teplotě 37 °C a s 5 % oxidu uhličitého v inkubátoru.

4.1.2 Ošetření buněk 5-chloro-2'-deoxyuridinem (CldU) a olaparibem pro zaznačení nascentního vlákna DNA

Buňky byly vysazeny na sklička o průměru 12 mm do kultivační misky o ploše 75 cm² a ponechány kultivaci po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C a s 5 % oxidu uhličitého v růstovém inkubátoru. Po 48 hodinách byla sklička s buňkami přenesena do čerstvého živného média DMEM a ošetřena kombinací CldU (10 $\mu\text{mol/l}$) s olaparibem (10 $\mu\text{mol/l}$) a kultivována po dobu 16 hodin přes noc při teplotě 37 °C a s 5 % oxidu uhličitého v růstovém inkubátoru.

4.2 Imunofluorescence

Po ošetření buněk a jejich kultivaci bylo přítomné médium odsáto pomocí vakuové pumpy a buňky byly dvakrát promyty ledově vychlazeným fosfátovým pufrům PBS. Následně byla provedena pre-extrakce ledově vychlazeným 0,2% roztokem Triton X-100 po dobu 5 minut při laboratorní teplotě na ledu. Po inkubaci bylo pre-extrakční činidlo odsáto pomocí vakuové pumpy a buňky byly dvakrát promyty ledově vychlazeným PBS. Následně byly buňky zafixovány 4% roztokem formaldehydu po dobu 15 minut při laboratorní teplotě na ledu. Po inkubaci byl formaldehyd odpipetován do speciální odpadní lahve. Buňky byly opět dvakrát promyty PBS.

Po fixaci byly buňky permeabilizovány 0,2% roztokem Triton X-100 po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Po permeabilizaci byly buňky přeneseny na parafilm na podložním skle. Na jednotlivá sklička bylo nanášeno 300 μl živného média DMEM z důvodu ekvilibrace skla na médium s protilátkou.

Byla připravena směs primární protilátky anti-CldU v poměru 1:100 do živného média. Směs primární protilátky byla řádně promíchána na třepačce Vortex. Na jednotlivá sklička bylo nanášeno 50 μl směsi primární protilátky a následovala inkubace po dobu 60 minut v tmavém prostředí při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla sklička třikrát promyta PBS a bylo opět nanášeno 300 μl živného média.

Byla připravena směs sekundární značené protilátky Alexa Fluor 568 anti-rat v poměru 1:500 do živného média. Směs sekundární protilátky byla řádně promíchána na třepačce Vortex. Na jednotlivá sklička bylo nanášeno 50 µl směsi sekundární protilátky a opět následovala inkubace po dobu 60 minut v tmavém prostředí při laboratorní teplotě.

Po inkubaci se směsí sekundární značené protilátky byla sklička třikrát promyta PBS. Byla připravena směs barviva DAPI (4',6-diamino-2-fenylindol) v poměru 1:1000 do PBS. Zásobní koncentrace barviva DAPI činila 1 µg/ml. Na jednotlivá sklička bylo nanášeno 80 µl směsi barviva DAPI a následovala inkubace po dobu 15 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po inkubaci s barvivem DAPI byla sklička třikrát promyta v PBS a jedenkrát v destilované vodě. Pomocí reverzní pinzety byla sklička přenesena na papírový ubrousek a byla zde ponechána po dobu 1-2 hodin pro kompletní vysušení sklička.

Na podložní sklo bylo v kapičkách nanášeno 1,5 µl speciálního mountovacího média Vectashield. Suchá sklička s ošetřenými buňkami byla po jednom přenesena pomocí reverzní pinzety do jednotlivých kapiček buňkami směrem dolů. Sklička byla nakonec zafixována k podložnímu sklu pomocí laku na nehty.

Takto připravená sklička byla následně analyzována nebo případně odložena do tmavého prostředí při teplotě 4 °C.

4.2.1 Umlčení polymerázy PRIMPOL a esenciálních proteinů MRE11, EXO1 a CtIP pomocí siRNA interference

Do dvou 1,5ml mikrozkušavek byly připraveny dva reakční mixy. První mikrozkušavka obsahovala 500 µl média OPTIMEM obsahující lipofektamin. Druhá mikrozkušavka obsahovala 500 µl média OPTIMEM obsahující siRNA o finální koncentraci 10 nmol/l. Po 5 minutách byly oba reakční mixy smíchány do jedné mikrozkušavky, promíchány a inkubovány po dobu 15 minut při laboratorní teplotě.

Z kultivační misky s buňkami byly odsáty 3 ml živného média, poté byl přidán 1 ml siRNA transfekčního mixu. Buňky byly následně kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C s 5 % oxidu uhličitého po dobu 16 hodin. Na druhý den byly buňky pasážovány a připraveny na imunofluorescenční experimenty podobně jako je popsáno v kapitolách 4.1 a 4.2.

4.3 Imunofluorescenční mikroskopie

Po provedení imunofluorescence byla zafixovaná sklička nasnímána a analyzována pomocí skenovacího mikroskopu Olympus ScanR. Podložní sklo se zafixovanými skličky bylo otočeno o 180° a vloženo na stolek nacházející se těsně nad objektivem. V rámci snímání bylo nastaveno 64 až 100 pozic na skličko v závislosti na počtu buněk na skličku. Za ostření byl zodpovědný hardwarový autofokus firemního nastavení, hrubé ostření bylo v počtu 10 ostřících rovin a jemné ostření také

v počtu 10 ostřících rovin. Intenzita výbojky byla nastavena v poměru 1000 milisekund pro červené excitační spektrum. Intenzita modrého excitačního spektra byla 3 sekundy pro DAPI. Buňky byly nasnímány objektivem v suchém prostředí se zvětšením 40x. Následně byly manuálně určeny středy na sklíčkách a bylo spuštěno jejich focení, které trvalo přibližně 1 hodinu.

Analýza probíhala v softwaru ScanR Analysis software, kde se hodnotila průměrná intenzita Alexa Azide 568 na buňkách, které prošly filtrací na správnou velikost a odstranění nespecifického signálu. Výsledkem analýzy byl textový soubor obsahující intenzity signálu odpovídající Alexa Azide 568 pro každou buňku jednotlivě. Tímto způsobem bylo vyexportováno každé sklíčko zvlášť. Získaná data sloužila pro přípravu kvantitativního vyhodnocení. Dále byly vyexportovány čtvercové mozaiky ve velikosti 4x4 odpovídající náhodným buňkám po nafocení. Čtvercové mozaiky rovněž sloužily jako reprezentativní obrázky ke kvantitativnímu vyhodnocení. Na čtvercových mozaikách je z důvodu lepšího rozlišení a detekce zobrazen zelený signál, který byl manuálně převeden v ScanR analysis software z červeného signálu odpovídající protilátce AlexaAzide 568. Tato analýza se také označuje jako kvantitativní cytometrie založená na obrázku a je běžně používanou analýzou pro skenovací mikroskop Olympus ScanR.

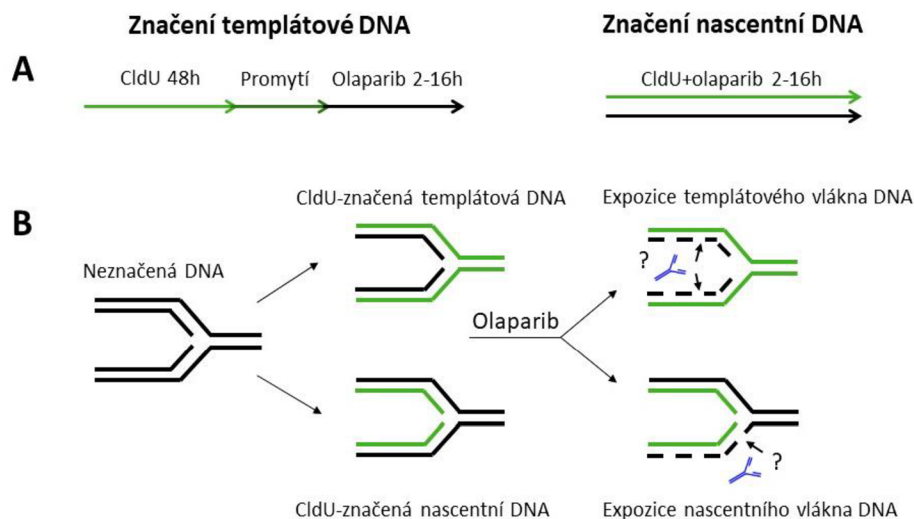
Grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism 8. V rámci analýzy bylo nasnímáno více než 1000 buněk na jednotlivé podmínky ošetření buněk.

5 VÝSLEDKY

5.1 Analýza jednovláknových DNA mezer na templátovém a nascentním vlákně DNA po ošetření olaparibem

Cílem metody značení DNA pomocí pseudobáze CldU s následným ošetřením buněk olaparibem bylo zjistit pozici jednovláknových DNA mezer, které vznikají během replikace DNA. Pro určení pozic jednovláknových DNA mezer na nascentní či templátové DNA byly provedeny dva odlišné principy značení s následným ošetřením buněk olaparibem (PARPi) v různých časových intervalech od 2 do 16 hodin (Obrázek 1A).

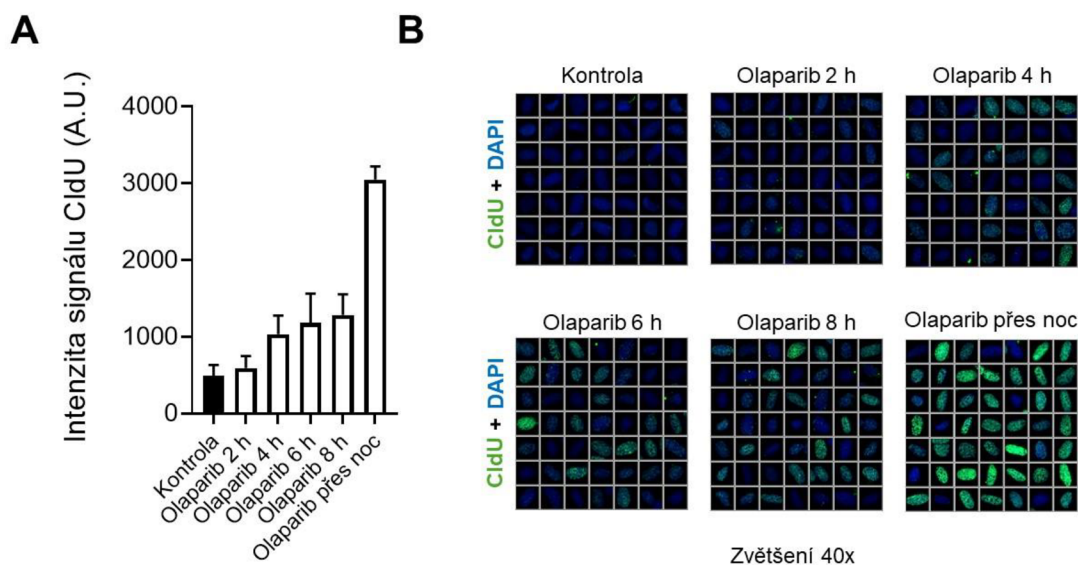
Jestliže se jednovláknové DNA mezery nacházely na nascentním vlákně DNA, detekovaný CldU signál bude pocházet ze značeného templátového vlákna DNA. Tato vizualizace je možná díky navázané anti-CldU protilátce na pseudobázi CldU inkorporované na templátovém vlákně DNA. K tomu dochází pouze v případě, jestliže se na nascentním vlákně DNA nachází jednovláknové DNA mezery, čímž dojde k odhalení chloridové báze s navázanou anti-CldU protilátkou na templátové DNA. Mezery nemohou být vizualizovány samy o sobě, jelikož se nejedná o strukturu. Naopak, pokud se jednovláknové DNA mezery nacházely na templátovém vlákně DNA, detekovaný CldU signál bude pocházet ze značeného nascentního vlákna DNA (Obrázek 1B).



Obrázek 1: (A) Reprezentativní schéma značení templátové a nascentní DNA prostřednictvím CldU. (B) Reprezentativní schéma expozice templátového a nascentního vlákna DNA pro určení pozice vzniku jednovláknových DNA mezer po ovlivnění olaparibem na templátovém nebo nascentním vlákně DNA vizualizovaných pomocí anti-CldU protilátky. Převzato a upraveno podle (Leung *et al.*, 2023).

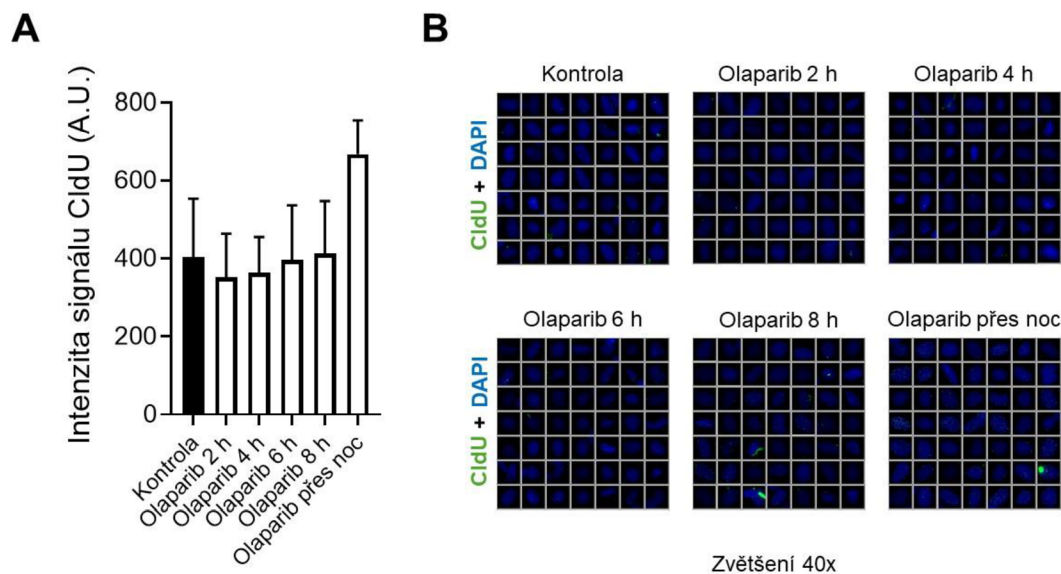
Analýza jednovláknových DNA mezer po ošetření buněk olaparibem v různých časových intervalech (od 2 do 16 hodin) ukázala, že došlo k detekci nárůstu CldU signálu, pravděpodobně pocházejícího ze značené templátové DNA korespondující jednovláknovým DNA mezerám

lokalizovaných na nascentní DNA (Obrázek 2A). Byl úspěšně detekován nárůst CldU signálu pomocí skenovacího mikroskopu Olympus ScanR, a to už po 4 hodinách inkubace s olaparibem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Zároveň můžeme pozorovat slabý nárůst CldU signálu již po 4 hodinách inkubace s olaparibem, což může značit rychlou tvorbu jednovláknových DNA mezer během replikace DNA, ačkoliv je kvantitativní analýza obtížně vyhodnotitelná. Naopak nejvyšší signál byl detekovaný po 16 hodinách inkubace s olaparibem (Obrázek 2A, 2B).



Obrázek 2: (A) Graf znázorňující intenzitu detekovaného CldU signálu odpovídajícího jednovláknovým DNA mezerám lokalizovaných na nascentním vlákně DNA při zaznačení templátového vlákna DNA po různých časových intervalech (2, 4, 6, 8 hodin + 16 h přes noc) inkubace buněčné linie U2OS s olaparibem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty naměřené intenzity signálu CldU a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD). (B) Repräsentativní obrázky buněčné linie U2OS pořízené pomocí skenovacího mikroskopu Olympus ScanR při zvětšení 40x v suchém prostředí. Jednotlivé obrázky zobrazují detekovaný CldU signál (zeleně), který odpovídá jednovláknovým DNA mezerám lokalizovaných na nascentním vlákně DNA při zaznačení templátového vlákna DNA. Modře jsou zobrazena jádra jednotlivých buněk díky fluorescenčnímu barvivu DAPI. Buňky byly ošetřeny pseudobází CldU po dobu 48 hodin a následně ošetřeny olaparibem po dobu různých časových intervalů (2, 4, 6, 8 hodin + 16 h přes noc). Buňky byly vizualizovány pomocí anti-CldU protilátky.

Na druhou stranu, při zaznačení nascentního vlákna DNA, nebyl oproti kontrole zaznamenán nárůst CldU signálu (Obrázek 3A). V časových intervalech od 2 do 8 hodin inkubace buněk s olaparibem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ byl nárůst CldU signálu nezávisle na kontrole minimální, což znamená, že se jednovláknové DNA mezery s největší pravděpodobností nevytvářejí na templátovém vlákně DNA. Oproti předchozímu případu byl zaznamenán pouze minimální nárůst CldU signálu po 16 hodinách inkubace s olaparibem (Obrázek 3A). Ačkoli se jedná o minimální nárůst, je velmi pravděpodobné, že buňky ošetřené pseudobází CldU v kombinaci s olaparibem po dobu 16 hodin, již přešly z první S-fáze buněčného cyklu do druhé S-fáze. Ve druhé S-fázi buněčného cyklu se pseudobáze CldU již nemusí nacházet na nascentním vlákně DNA, avšak na templátovém vlákně DNA, které bylo olaparibem exponováno (Obrázek 3A, 3B).



Obrázek 3: (A) Graf znázorňující intenzitu detekovaného CldU signálu odpovídajícího jednovláknovým DNA mezerám lokalizovaným na templátovém vlákně DNA při zaznačení nascentního vlákna DNA po různých časových intervalech (2, 4, 6, 8 hodin + 16 h přes noc) inkubace buněčné linie U2OS s olaparibem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty naměřené intenzity signálu CldU a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD). (B) Reprezentativní obrázky buněčné linie U2OS pořízené pomocí skenovacího mikroskopu Olympus ScanR při zvětšení 40x v suchém prostředí. Jednotlivé obrázky zobrazují detekovaný CldU signál (zeleně), který odpovídá jednovláknovým DNA mezerám lokalizovaným na templátovém vlákně DNA při zaznačení nascentního vlákna DNA. Modře jsou zobrazena jádra jednotlivých buněk díky fluorescenčnímu barvivu DAPI. Buňky byly ošetřeny pseudobází CldU o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ v kombinaci s olaparibem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ po dobu různých časových intervalů (2, 4, 6, 8 hodin + 16 h přes noc). Buňky byly vizualizovány pomocí anti-CldU protilátky.

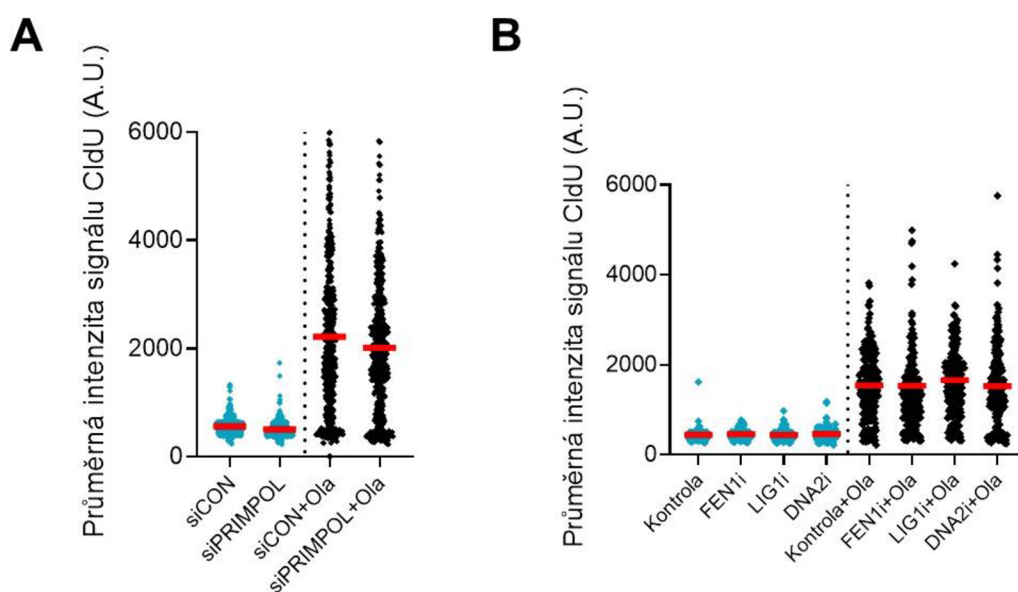
5.2 Stanovení možných inhibitorů nukleáz zodpovědných za tvorbu jednovláknových DNA mezer

Tato část experimentu si kladla za cíl vyhledat specifické inhibitory esenciálních proteinů zodpovědných za vznik jednovláknových DNA mezer. Pokud by došlo k poklesu CldU signálu po jejich inhibici, mohlo by se potenciálně jednat o faktory přispívající ke zvýšené tvorbě jednovláknových DNA mezer. Zároveň nás zajímalo, jaký faktor stojí za vysokým nárůstem CldU signálu, který pocházel ze značeného templátového vlákna DNA po 16 hodinách inkubace s olaparibem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$.

Nejprve bylo provedeno umlčení polymerázy PRIMPOL pomocí siRNA (Obrázek 4A). Jedná se o proces umlčení genu, jehož produkt, který tento gen kóduje, není exprimován. Polymeráza PRIMPOL je zodpovědná za repriming v případě přítomnosti léze na vlákně DNA. Léze, které se nachází na vlákně DNA, bývají opravovány prostřednictvím enzymu PARP1. Avšak po ovlivnění buněk olaparibem, zůstane opravný enzym PARP1 na vlákně DNA zablokovaný. Umlčení bylo provedeno z toho důvodu, že v případě zablokovaného enzymu PARP1 na vlákně a přítomnosti polymerázy PRIMPOL, polymeráza tuto překážku přeskóčí a vynechá krátký úsek během syntézy

(Kang et al., 2021). To by mohl být jeden z možných zdrojů jednovláknových DNA mezer po ošetření buněk olaparibem.

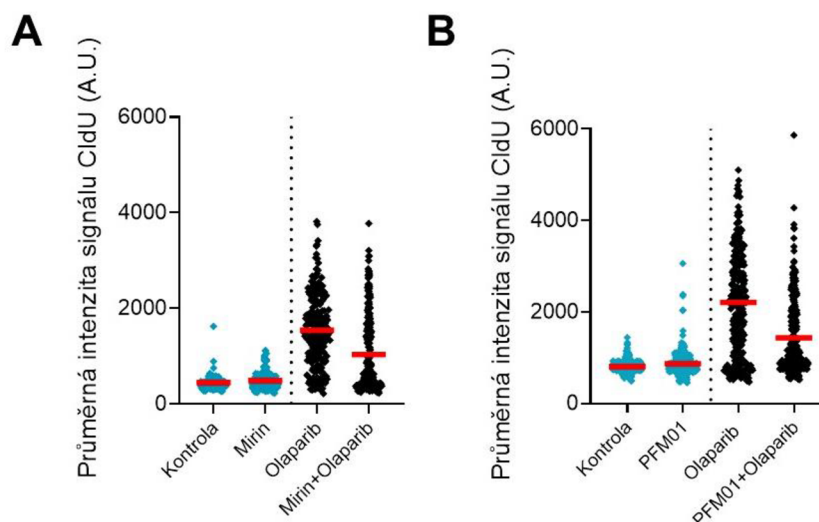
Zároveň byla provedena inhibice enzymů podílejících se na zpracování Okazaki fragmentů, FEN1/DNA2 a LIG1 (Obrázek 4B). Za fyziologické situace je tato dráha plně funkční, avšak v BRCA defektních buňkách nikoliv, což by mohl být další zdroj vzniku jednovláknových DNA mezer (Cong et al., 2021). Bylo však zjištěno, že jak umlčení polymerázy PRIMPOL, tak ani inhibice FEN1/DNA2 a LIG1 nepřispívá ke zvýšenému vzniku jednovláknových DNA mezer po 16 hodinách inkubace s olaparibem (Obrázek 4A černě, 4B černě). Umlčení polymerázy PRIMPOL a inhibice FEN1/DNA2 a LIG1 bez přítomnosti olaparibu taktéž nepřispívá ke vzniku jednovláknových DNA mezer (Obrázek 4A modře, 4B modře).



Obrázek 4: (A) Graf znázorňující průměrnou intenzitu detekovaného CldU signálu po umlčení polymerázy PRIMPOL. (B) Graf znázorňující průměrnou intenzitu detekovaného CldU signálu po inhibici faktorů podílejících se na zpracování Okazaki fragmentů (FEN1, LIG1, DNA2) pomocí inhibitorů FEN1i, LIG1i, DNA2i o koncentracích 10 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 16 hodin inkubace v růstovém inkubátoru při 37 $^{\circ}\text{C}$ s 5 % oxidu uhličitého. Modře jsou zde znázorněny intenzity signálu CldU detekovaného u buněčné linie U2OS bez ovlivnění olaparibem. Černě jsou zde znázorněny intenzity signálu CldU u buněčné linie U2OS, která byla ovlivněna olaparibem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 16 hodin. Červeně je vyznačena průměrná hodnota intenzity signálu CldU.

Na základě získaných výsledků bylo dále předpokládáno, zda za vysokým nárůstem CldU signálu po inkubaci buněk s olaparibem, a tedy za přítomnost jednovláknových DNA mezer na nascentním vlákně DNA, nestojí zvýšená aktivita nukleázového komplexu MRN (MRE11-RAD50-NBS1). Tyto jednovláknové DNA mezery mohou být zpracovány do dvouvláknových zlomů z důvodu opravy DNA pomocí HR nebo NHEJ. Byla provedena inhibice nukleázy MRE11 prostřednictvím specifických inhibitorů PFM01 a mirin o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ spolu s olaparibem po dobu 16 hodin inkubace (Obrázek 5A, 5B). Výsledky ukázaly, že při inhibici MRE11 pomocí inhibitorů mirin a PFM01 v kombinaci s olaparibem došlo k výraznému poklesu CldU signálu, tudíž by MRE11 mohla být důležitým faktorem, který by mohl přispívat ke zvýšené tvorbě jednovláknových DNA mezer

(Obrázek 5A, 5B černě). Navíc, inhibice MRE11 pomocí PFM01 a mirin nezpůsobuje jednovláknové DNA mezery sama o sobě (Obrázek 5A, 5B modře). To naznačuje, že samotná inhibice nukleáz nezpůsobuje konformační změny na DNA, avšak v kombinaci s olaparibem již ano.



Obrázek 5: (A) Graf znázorňující průměrnou intenzitu detekovaného CldU signálu po inhibici MRE11 pomocí inhibitoru mirin o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 16 hodin inkubace. (B) Graf znázorňující průměrnou intenzitu detekovaného CldU signálu po inhibici MRE11 pomocí inhibitoru PFM01 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 16 hodin inkubace. Modře jsou zde znázorněny intenzity signálu CldU detekovaného u buněčné linie U2OS bez ovlivnění olaparibem. Černě jsou zde znázorněny intenzity signálu CldU u buněčné linie U2OS, která byla ovlivněna olaparibem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 16 hodin. Červeně je vyznačena průměrná hodnota intenzity signálu CldU.

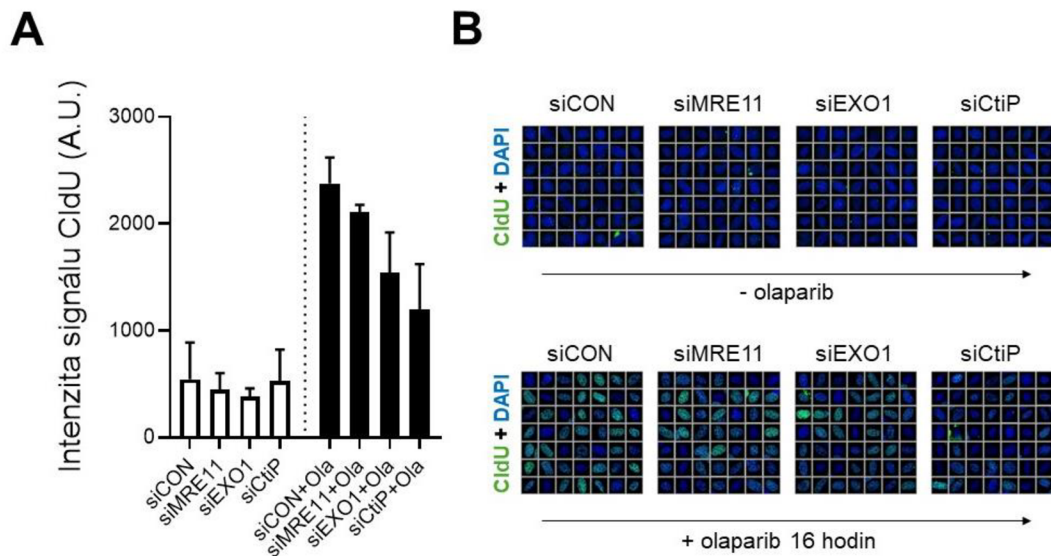
5.3 Umlčení esenciálního DSB proteinu CtIP způsobující největší pokles CldU signálu po ovlivnění buněk olaparibem

Na základě zjištění, že inhibice MRE11 způsobuje pokles CldU signálu po ovlivnění buněk olaparibem, bylo rozhodnuto vyřadit esenciální DNA nukleázy MRE11 a EXO1 současně s důležitým rozpoznávacím faktorem dvouvláknových zlomů, proteinem CtIP. Rozhodnutí bylo provedeno za účelem ověření hypotézy, zdali zvýšený nárůst CldU signálu po ovlivnění olaparibem po dobu 16 hodin nesouvisí se zpracováním jednovláknových DNA mezer na dvouvláknové zlomy ve druhé S-fázi buněčného cyklu.

V tomto experimentu bylo provedeno umlčení esenciálních proteinů MRE11, EXO1 a CtIP, hrající roli v homologní rekombinaci a oprav dvouvláknových zlomů, pomocí siRNA interference. Bylo zjištěno, že umlčení MRE11, na rozdíl od její inhibice pomocí inhibitorů mirin a PFM01, nezpůsobila výrazný pokles jednovláknových DNA mezer (Obrázek 6A černě, 6B) po ovlivnění buněk olaparibem. Výraznější pokles CldU signálu byl zaznamenán až po umlčení faktoru EXO1 a současně nejvýraznější pokles (přibližně 50 %) byl zaznamenán po umlčení faktoru CtIP za současného ovlivnění buněk olaparibem (Obrázek 6A černě, 6B). Umlčení jednotlivých nukleáz

nezpůsobilo zvýšení CldU signálu oproti kontrolnímu umlčení, což znamená, že samotné umlčení daných nukleáz nezpůsobuje zvýšenou tvorbu jednovláknových DNA mezer bez přítomnosti olaparibu (Obrázek 6A bílé, 6B).

Naše výsledky naznačují, že vysoký nárůst CldU signálu, odpovídající jednovláknovým DNA mezerám, souvisí s jejich zpracováním do dvouvláknových zlomů ve druhé S-fázi buněčného cyklu.



Obrázek 6: (A) Graf znázorňující intenzitu detekovaného signálu CldU po umlčení esenciálních nukleáz MRE11, EXO1 a rozpoznávacího faktoru dvouvláknových zlomů CtIP. Umlčení bylo provedeno pomocí siRNA interference. Bílé je zde znázorněno umlčení faktorů MRE11, EXO1 a CtIP u buněčné linie U2OS bez ovlivnění olaparibem. Černě je zde znázorněno umlčení faktorů MRE11, EXO1 a CtIP u buněčné linie U2OS, která byla ovlivněna olaparibem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 16 hodin. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty naměřené intenzity signálu CldU a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD). (B) Reprezentativní obrázky buněčné linie U2OS pořízené pomocí skenovacího mikroskopu Olympus ScanR při zvětšení 40x v suchém prostředí. Jednotlivé obrázky zobrazují detekovaný CldU signál (zeleně), po umlčení faktorů MRE11, EXO1 a CtIP bez olaparibu (nahore) a s olaparibem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 16 hodin inkubace (dole). Modře jsou zobrazena jádra jednotlivých buněk díky fluorescenčnímu barvivu DAPI.

6 DISKUZE

V této bakalářské práci byla pozornost zaměřena na olaparibem indukované jednovláknové DNA mezery jakožto alternativní model buněčné letality zprostředkované inhibitory PARP, na rozdíl od původního modelu degradace replikační vidličky a indukce dvouvláknových zlomů v BRCA defektních buňkách (Helleday, 2011; Thakar & Moldovan, 2021). Náš přístup vycházel z článku (Leung et al., 2023), kde bylo zkoumáno, jak ATR kináza chrání replikační vidličky vystavené replikačnímu stresu. Jejich výsledky se zabývaly zejména lokalizací jednovláknových DNA mezer indukovaných inhibitory ATR prostřednictvím expozice templátového či nascentního vlákna DNA a zaznačení jednotlivých vláken pomocí CldU za nedenaturujících podmínek s následnou detekcí signálu (Leung et al., 2023). Jejich přístup byl námi využit pro určení, na jakém vlákně DNA olaparib indukuje vznik jednovláknových DNA mezer.

Naše výsledky ukázaly, že při zaznačení templátového vlákna DNA prostřednictvím CldU, olaparib indukuje vznik jednovláknových DNA mezer na nascentním vlákně DNA, což může odrážet různé změny struktury replikační vidličky. Příkladem je rozpojení DNA helikázy a polymerázy, degradace nascentního vlákna DNA, tvorba jednovláknových DNA mezer nebo resekce nascentního vlákna DNA z konců DNA. Na druhou stranu, při zaznačení nascentního vlákna DNA, se nám nepodařilo jednovláknové DNA mezery na templátovém vlákně detekovat. To znamená, že jednovláknové DNA mezery indukované olaparibem se netvoří na obráceném rameni replikační vidličky, nebo prostřednictvím degradace templátového vlákna DNA (Leung et al., 2023). Bylo zaznamenáno, že vysoká tvorba olaparibem indukovaných jednovláknových DNA mezer je závislá na čase, jelikož detekovaný CldU signál v průběhu času taktéž roste, což je v souladu s důkazy, že PARPi způsobují defekty v průběhu replikace (Maya-Mendoza et al., 2018; Cong et al., 2021). Na druhou stranu byl zaznamenán až neobvykle vysoký CldU signál, spojený s tvorbou jednovláknových DNA mezer, po 16 hodinách inkubace s olaparibem. To by mohlo odpovídat třem možným situacím, které by tento vysoký signál mohly způsobovat. Po šestnáctihodinové expozici olaparibem by mohlo jednovláknových DNA mezer vznikat více, jednovláknové DNA mezery by mohly být větší nebo by mohly být zpracovány do dvouvláknových zlomů. Naším cílem bylo zjistit, co je příčinou tak neobvykle vysokého CldU signálu po 16 hodinách inkubace s olaparibem.

Bylo provedeno umlčení PRIMPOL, specializované polymerázy, která je zodpovědná za repriming DNA v případě přítomnosti léze na vlákně (Kang et al., 2021). Vzhledem k tomu, že olaparib zachycuje PARP1 na vlákně DNA, je možné, že repriming zprostředkovaný PRIMPOL může zodpovídat za vzniklé jednovláknové DNA mezery indukované olaparibem po 16 hodinách inkubace. Bylo také zjištěno, že ovlivnění buněk PARPi, způsobuje urychlení replikační vidličky (Maya-Mendoza et al., 2018). Aktualizované poznatky však naznačují, že zvýšená citlivost karcinomů s deficitem BRCA1 k inhibici PARP, by mohla být způsobena spíše jednovláknovými DNA mezerami než urychlením replikačních vidliček (Cong et al., 2021; Panzarino et al., 2021).

Dále bylo zjištěno, že urychlení replikačních vidliček po ovlivnění buněk olaparibem, může být spojeno s PRIMPOL repriming procesy. Tento závěr je podpořen tím, že deplece PRIMPOL vrací rychlost replikačních vidliček na úroveň podobnou normálním buněčným typům (Giansanti et al., 2022). V souladu s tím jsme předpokládali, že neobvykle vysoký nárůst CldU signálu, který je spojen s olaparibem indukovanými jednovláknovými DNA mezerami, může záviset na PRIMPOL reprimingu, stejně jako na urychlení replikačních vidliček (Giansanti et al., 2022). Naše výsledky však ukázaly, že jednovláknové DNA mezery indukované olaparibem, nejsou způsobené procesem PRIMPOL repriming, jelikož při depleci PRIMPOL nebyl detekovaný pokles CldU signálu. Současně bylo navrženo, že olaparib indukuje vznik jednovláknových DNA mezer v důsledku defektní syntézy opoždujícího vlákna skrze překážky vznikající v místech zpracování Okazaki fragmentů (Cong et al., 2021). Bylo rovněž prokázáno, že PARPi brání v dokončení syntézy Okazaki fragmentů (Vaitsiankova et al., 2022), proto jsme předpokládali, že defektní OFP mohou přispívat ke zvýšené tvorbě jednovláknových DNA mezer. Na základě toho, byla provedena inhibice OFP proteinů (FEN1, DNA2, LIG1) jak s olaparibem, tak bez něj. Nicméně, podobně jako při umlčení PRIMPOL, nebyl zaznamenán pokles CldU signálu. To naznačuje, že ani jeden z těchto mechanismů nepřispívá k abnormální tvorbě jednovláknových DNA mezer po šestnáctihodinovém působení olaparibu.

Zajímavým zjištěním je, že PARPi generuje tvorbu dvouvláknových zlomů ve druhé S-fázi buněčného cyklu. V první S-fázi PARPi vyvolá tvorbu jednovláknových DNA mezer za replikační vidličkou. Tím, že PARPi zablokuje enzym PARP1 na poškozeném vlákně DNA, zabrání tak dokončení opravy a vyplnění mezer až do druhé S-fáze. To vede ke kolizím replikační vidličky s jednovláknovými DNA mezerami, což způsobuje tvorbu kritických dvouvláknových zlomů (Simoneau et al., 2021). Na základě toho jsme předpokládali, že zvýšený CldU signál by mohl být způsoben zpracováním jednovláknových DNA mezer do dvouvláknových zlomů skrze homologní rekombinaci. Tento předpoklad byl v souladu s našimi výsledky. Doba dělení buněk U2OS odpovídá přibližně 14 hodinám, proto se můžeme domnívat, že po šestnáctihodinové inkubaci buněk s olaparibem, jsou mezery rozpoznány prostřednictvím BRCA1 a faktoru CtiP a následně zpracovány do dvouvláknových zlomů pomocí komplexu RAD50/MRN/NBS1. Jeden z klíčových kroků opravy dvouvláknových zlomů je rovněž zpracování konců DNA. Proto jsme předpokládali, že zvýšená aktivita DNA nukleáz by mohla být zdrojem neobvykle vysokého CldU signálu, který je spojen se vznikem jednovláknových DNA mezer. Podle očekávání bylo detekováno podstatné snížení CldU signálu po inhibici MRE11 prostřednictvím inhibitorů mirin a PFM01. To nás ovšem vedlo k další hypotéze, zda narušení MRE11 a EXO1, které jsou zodpovědné za krátkou, respektive dlouhou resekci DNA, spolu s klíčovým rozpoznávacím faktorem CtiP, nemohou být zdrojem zvýšeného CldU signálu. Bylo tak provedeno umlčení těchto faktorů, přičemž výsledky ukázaly, že umlčení EXO1 a CtiP vedla k podstatnému snížení CldU signálu. Snížení CldU signálu po umlčení rozpoznávacího faktoru CtiP může být však způsobeno i sníženou replikací DNA, jelikož

jednovláknové DNA mezery vznikají pouze během funkční replikace DNA. Umlčení MRE11 však nezpůsobilo výrazné snížení CldU signálu na rozdíl od její inhibice. Nemůžeme vyloučit, že by umlčení MRE11 nemohla v buňkách spustit kompenzační mechanismy, které by tuto nukleázu nahradily. Navíc se ukázalo, že resekce konců DNA může probíhat i bez funkční nukleázy MRE11.

Navrhujeme tedy, že neobvyklé zvýšení CldU signálu by mohlo být způsobeno rozpoznáním a následným zpracováním jednovláknových DNA mezer do kritických dvouvláknových zlomů zejména ve druhé S-fázi buněčného cyklu. V souladu s tím taktéž navrhujeme, že zdrojem detekovaného neobvykle vysokého CldU signálu, je proces resekce konců DNA, který odhaluje templátovou DNA s navázanou pseudobází CldU, která je pak detekována anti-CldU protilátkou. Pokud by bylo vlákno DNA neporušené, anti-CldU protilátka by se nemohla navázat na vyčnívající chloridovou bázi, tudíž by nedošlo k detekci CldU signálu. Současně největší snížení CldU signálu způsobilo umlčení rozpoznávacího faktoru CtiP, pravděpodobně díky neschopnosti rozpoznat jednovláknové DNA mezery. To znamená, že zpracování jednovláknových DNA mezer na dvouvláknové zlomy není funkční a tyto mezery tak nejsou do DSB zpracovány. Naše výsledky se shodují s poznatky v článku (Hale et al., 2023), kde je popisováno, že jednovláknové mezery v DNA po ovlivnění hydroxyureou a cisplatinou, jsou také zpracovávány do dvouvláknových zlomů prostřednictvím MRN komplexu.

7 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na analýzu a následnou detekci jednovláknových DNA mezer po ovlivnění buněk olaparibem. Současně byla zaměřena na příčinu neobvyklého nárůstu CldU signálu po prodloužené expozici olaparibem po dobu 16 hodin a na faktory, které mohou být odpovědné za tento neobvyklý nárůst CldU signálu.

Bylo zjištěno, že olaparib indukuje vznik jednovláknových DNA mezer na nově syntetizovaném vlákně DNA. Bylo taktéž zjištěno, že jednovláknové DNA mezery po ovlivnění buněk olaparibem po dobu 16 hodin, jsou pravděpodobně zpracovávány do dvouvláknových zlomů prostřednictvím klíčových proteinů pro rozpoznání a zpracování jednovláknových DNA mezer, jako jsou MRE11, EXO1 a CtIP. Dále bylo zjištěno, že toto zpracování probíhá ve druhé S-fázi buněčného cyklu a umlčení esenciálního proteinu CtIP snižuje CldU signál přibližně o 50 %. Navíc inhibice nukleázy MRE11 taktéž přispívá k poklesu olaparibem indukovaného CldU signálu. Naopak umlčení specializované polymerázy PRIMPOL a inhibice OFP proteinů nepřispívají ke zvýšenému CldU signálu po ovlivnění buněk olaparibem po dobu 16 hodin.

Závěrem lze konstatovat, že toxicita jednovláknových DNA mezer je zvýšena ve druhé S-fázi buněčného cyklu z důvodu vzniku dvouvláknových zlomů. Tato zjištění přispívají k rozšíření znalostí o problematice PARP inhibitorů a jednovláknových DNA mezer a mohou sloužit jako základ pro navazující výzkum cytotoxicity PARP inhibitorů, které hrají roli v genomové nestabilitě nádorových buněk.

8 LITERATURA

Alemasova, E., & Lavrik, O. (2019). Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins. *Nucleic Acids Research*, 47(8), 3811-3827. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz120>

Ali, R., Alabdullah, M., Algethami, M., Alblihy, A., Miligy, I., Shoqafi, A., Mesquita, K., Abdel-Fatah, T., Chan, S., Chiang, P., Mongan, N., Rakha, E., Tomkinson, A., & Madhusudan, S. (2021). Ligase 1 is a predictor of platinum resistance and its blockade is synthetically lethal in XRCC1 deficient epithelial ovarian cancers. *Theranostics*, 11(17), 8350-8361. <https://doi.org/10.7150/thno.51456>

Amé, J., Spenlehauer, C., & de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *BioEssays*, 26(8), 882-893. <https://doi.org/10.1002/bies.20085>

Arnott, S., Hutchinson, F., Spencer, M., Wilkins, M., Fuller, W., & Langridge, R. (1966). X-Ray Diffraction Studies of Double Helical Ribonucleic Acid. *Nature*, 211(5046), 227-232. <https://doi.org/10.1038/211227a0>

Avery, O., MacLeod, C., & McCarty, M. (1944). STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES. *Journal of Experimental Medicine*, 79(2), 137-158. <https://doi.org/10.1084/jem.79.2.137>

Bai, G., Kermi, C., Stoy, H., Schiltz, C., Bacal, J., Zaino, A., Hadden, M., Eichman, B., Lopes, M., & Cimprich, K. (2020). HLTf Promotes Fork Reversal, Limiting Replication Stress Resistance and Preventing Multiple Mechanisms of Unrestrained DNA Synthesis. *Molecular Cell*, 78(6), 1237-1251.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.031>

Bai, P. (2015). Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance. *Molecular Cell*, 58(6), 947-958. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.034>

Bansal, P. (1999). Book Reviews. *Indian Journal of Public Administration*, 45(1), 106-108. <https://doi.org/10.1177/0019556119990112>

Barlow, J., & Nussenzweig, A. (2014). Replication initiation and genome instability: a crossroads for DNA and RNA synthesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(23), 4545-4559. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1721-1>

Beermink, H., & Morrical, S. (1999). RMPs: recombination/replication mediator proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(10), 385-389. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01451-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01451-6)

Bell, S., & Dutta, A. (2002). DNA Replication in Eukaryotic Cells. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 333-374. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135425>

Berti, M., Ray Chaudhuri, A., Thangavel, S., Gomathinayagam, S., Kenig, S., Vujanovic, M., Odreman, F., Glatter, T., Graziano, S., Mendoza-Maldonado, R., Marino, F., Lucic, B., Biasin, V., Gstaiger, M., Aebersold, R., Sidorova, J., Monnat, R., Lopes, M., & Vindigni, A. (2013). Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(3), 347-354. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2501>

- Bhagwat, M., & Nossal, N. (2001). Bacteriophage T4 RNase H Removes Both RNA Primers and Adjacent DNA from the 5' End of Lagging Strand Fragments. *Journal of Biological Chemistry*, 276(30), 28516-28524. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103914200>
- Bryant, H., Schultz, N., Thomas, H., Parker, K., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N., & Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 434(7035), 913-917. <https://doi.org/10.1038/nature03443>
- Burgers, P., & Kunkel, T. (2017). Eukaryotic DNA Replication Fork. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 417-438. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044709>
- Caldecott, K., Aoufouchi, S., Johnson, P., & Shall, S. (1996). XRCC1 Polypeptide Interacts with DNA Polymerase and Possibly Poly (ADP-Ribose) Polymerase, and DNA Ligase III Is a Novel Molecular 'Nick-Sensor' In Vitro. *Nucleic Acids Research*, 24(22), 4387-4394. <https://doi.org/10.1093/nar/24.22.4387>
- Cantor, S. (2021). Revisiting the BRCA-pathway through the lens of replication gap suppression. *DNA Repair*, 107. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103209>
- Clamp, A., & Jayson, G. (2015). PARP inhibitors in BRCA mutation-associated ovarian cancer. *The Lancet Oncology*, 16(1), 10-12. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71172-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71172-6)
- Clark, D., & Pazdernik, N. (2013). Cell Division and DNA Replication. In *Molecular Biology* (pp. 274-308). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378594-7.00010-X>
- Cong, K., & Cantor, S. (2022). Exploiting replication gaps for cancer therapy. *Molecular Cell*, 82(13), 2363-2369. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.04.023>
- Cong, K., Peng, M., Kousholt, A., Lee, W., Lee, S., Nayak, S., Kraiss, J., VanderVere-Carozza, P., Pawelczak, K., Calvo, J., Panzarino, N., Turchi, J., Johnson, N., Jonkers, J., Rothenberg, E., & Cantor, S. (2021). Replication gaps are a key determinant of PARP inhibitor synthetic lethality with BRCA deficiency. *Molecular Cell*, 81(15), 3128-3144.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.06.011>
- Costantini, S., Woodbine, L., Andreoli, L., Jeggo, P., & Vindigni, A. (2007). Interaction of the Ku heterodimer with the DNA ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK. *DNA Repair*, 6(6), 712-722. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.12.007>
- Creager, R., Li, Y., & MacAlpine, D. (2015). SnapShot: Origins of DNA Replication. *Cell*, 161(2), 418-418.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.043>
- Curtin, N., & Szabo, C. (2013). Therapeutic applications of PARP inhibitors: Anticancer therapy and beyond. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(6), 1217-1256. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2013.01.006>
- Dantzer, F., Giraud-Panis, M., Jaco, I., Amé, J., Schultz, I., Blasco, M., Koering, C., Gilson, E., Ménissier-de Murcia, J., de Murcia, G., & Schreiber, V. (2004). Functional Interaction between Poly(ADP-Ribose) Polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP Activity Negatively Regulates TRF2.

Molecular and Cellular Biology, 24(4), 1595-1607. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.4.1595-1607.2004>

Davis, A., & Chen, D. (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Translational Cancer Research*. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02>

Debnath, S., & Sharma, S. (2020). RECQ1 Helicase in Genomic Stability and Cancer. *Genes*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/genes11060622>

Drew, H., & Dickerson, R. (1981). Structure of a B-DNA dodecamer. *Journal of Molecular Biology*, 151(3), 535-556. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90009-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90009-7)

El-Khamisy, S. (2003). A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 31(19), 5526-5533. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg761>

Enemark, E., & Joshua-Tor, L. (2008). On helicases and other motor proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(2), 243-257. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.01.007>

Erzberger, J., & Berger, J. (2006). EVOLUTIONARY RELATIONSHIPS AND STRUCTURAL MECHANISMS OF AAA+ PROTEINS. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 35(1), 93-114. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.35.040405.101933>

Eustermann, S., Brockmann, C., Mehrotra, P., Yang, J., Loakes, D., West, S., Ahel, I., & Neuhaus, D. (2010). Solution structures of the two PBZ domains from human APLF and their interaction with poly(ADP-ribose). *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(2), 241-243. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1747>

Farmer, H., McCabe, N., Lord, C., Tutt, A., Johnson, D., Richardson, T., Santarosa, M., Dillon, K., Hickson, I., Knights, C., Martin, N., Jackson, S., Smith, G., & Ashworth, A. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434(7035), 917-921. <https://doi.org/10.1038/nature03445>

Filippo, J., Chi, P., Sehorn, M., Echin, J., Krejci, L., & Sung, P. (2006). Recombination Mediator and Rad51 Targeting Activities of a Human BRCA2 Polypeptide. *Journal of Biological Chemistry*, 281(17), 11649-11657. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601249200>

Franklin, R., & Gosling, R. (1953). Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. *Nature*, 171(4356), 740-741. <https://doi.org/10.1038/171740a0>

Frick, D., & Richardson, C. (2001). DNA Primases. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), 39-80. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.39>

Fugger, K., Bajrami, I., Silva Dos Santos, M., Young, S., Kunzelmann, S., Kelly, G., Hewitt, G., Patel, H., Goldstone, R., Carell, T., Boulton, S., MacRae, J., Taylor, I., & West, S. (2021). Targeting the nucleotide salvage factor DNPH1 sensitizes BRCA -deficient cells to PARP inhibitors. *Science*, 372(6538), 156-165. <https://doi.org/10.1126/science.abb4542>

- Fu, X., Li, P., Zhou, Q., He, R., Wang, G., Zhu, S., Bagheri, A., Kupfer, G., Pei, H., & Li, J. (2024). Mechanism of PARP inhibitor resistance and potential overcoming strategies. *Genes & Diseases*, *11*(1), 306-320. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.02.014>
- Gagné, J., Isabelle, M., Lo, K., Bourassa, S., Hendzel, M., Dawson, V., Dawson, T., & Poirier, G. (2008). Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. *Nucleic Acids Research*, *36*(22), 6959-6976. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn771>
- Gaillard, H., García-Muse, T., & Aguilera, A. (2015). Replication stress and cancer. *Nature Reviews Cancer*, *15*(5), 276-289. <https://doi.org/10.1038/nrc3916>
- García-Muse, T., & Aguilera, A. (2016). Transcription–replication conflicts: how they occur and how they are resolved. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(9), 553-563. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.88>
- Ghosh, A., & Bansal, M. (2003). A glossary of DNA structures from A to Z. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, *59*(4), 620-626. <https://doi.org/10.1107/S0907444903003251>
- Giansanti, C., Manzini, V., Dickmanns, A., Dickmanns, A., Palumbieri, M., Sanchi, A., Kienle, S., Rieth, S., Scheffner, M., Lopes, M., & Dobbstein, M. (2022). MDM2 binds and ubiquitinates PARP1 to enhance DNA replication fork progression. *Cell Reports*, *39*(9). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110879>
- Gibbs-Seymour, I., Fontana, P., Rack, J., & Ahel, I. (2016). HPF1/C4orf27 Is a PARP-1-Interacting Protein that Regulates PARP-1 ADP-Ribosylation Activity. *Molecular Cell*, *62*(3), 432-442. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.008>
- Gilbert, D., Takebayashi, S., Ryba, T., Lu, J., Pope, B., Wilson, K., & Hiratani, I. (2011). Space and Time in the Nucleus: Developmental Control of Replication Timing and Chromosome Architecture. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *75*(0), 143-153. <https://doi.org/10.1101/sqb.2010.75.011>
- Gloor, J., Balakrishnan, L., & Bambara, R. (2010). Flap Endonuclease 1 Mechanism Analysis Indicates Flap Base Binding Prior to Threading. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(45), 34922-34931. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.165902>
- Gouloze, S., Cohen, A., & Rissmann, R. (2016). Olaparib. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *81*(1), 171-173. <https://doi.org/10.1111/bcp.12761>
- Guo, E., Ishii, Y., Mueller, J., Srivatsan, A., Gahman, T., Putnam, C., Wang, J., & Kolodner, R. (2020). FEN1 endonuclease as a therapeutic target for human cancers with defects in homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(32), 19415-19424. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009237117>
- Halazonetis, T., Gorgoulis, V., & Bartek, J. (2008). An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science*, *319*(5868), 1352-1355. <https://doi.org/10.1126/science.1140735>

Hale, A., Dhoonmoon, A., Straka, J., Nicolae, C., & Moldovan, G. (2023). Multi-step processing of replication stress-derived nascent strand DNA gaps by MRE11 and EXO1 nucleases. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42011-0>

Hall, J., Lee, M., Newman, B., Morrow, J., Anderson, L., Huey, B., & King, M. (1990). Linkage of Early-Onset Familial Breast Cancer to Chromosome 17q21. *Science*, 250(4988), 1684-1689. <https://doi.org/10.1126/science.2270482>

Hanzlikova, H., Kalasova, I., Demin, A., Pennicott, L., Cihlarova, Z., & Caldecott, K. (2018). The Importance of Poly(ADP-Ribose) Polymerase as a Sensor of Unligated Okazaki Fragments during DNA Replication. *Molecular Cell*, 71(2), 319-331.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.004>

Helleday, T. (2011). The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: Clearing up the misunderstandings. *Molecular Oncology*, 5(4), 387-393. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2011.07.001>

Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., & Sharma, R. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 8(3), 193-204. <https://doi.org/10.1038/nrc2342>

Hewitt, G., Borel, V., Segura-Bayona, S., Takaki, T., Ruis, P., Bellelli, R., Lehmann, L., Sommerova, L., Vancevska, A., Tomas-Loba, A., Zhu, K., Cooper, C., Fugger, K., Patel, H., Goldstone, R., Schneider-Luftman, D., Herbert, E., Stamp, G., Brough, R. et al. (2021). Defective ALC1 nucleosome remodeling confers PARPi sensitization and synthetic lethality with HRD. *Molecular Cell*, 81(4), 767-783.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.006>

Hogg, M., & Johansson, E. (2012). DNA Polymerase ϵ . In S. MacNeill (ed.), *The Eukaryotic Replisome: a Guide to Protein Structure and Function* (pp. 237-257). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4572-8_13

Hohegger, H., Dejsuphong, D., Fukushima, T., Morrison, C., Sonoda, E., Schreiber, V., Zhao, G., Saberi, A., Masutani, M., Adachi, N., Koyama, H., de Murcia, G., & Takeda, S. (2006). Parp-1 protects homologous recombination from interference by Ku and Ligase IV in vertebrate cells. *The EMBO Journal*, 25(6), 1305-1314. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601015>

Chilkova, O., Stenlund, P., Isoz, I., Stith, C., Grabowski, P., Lundstrom, E., Burgers, P., & Johansson, E. (2007). The eukaryotic leading and lagging strand DNA polymerases are loaded onto primer-ends via separate mechanisms but have comparable processivity in the presence of PCNA. *Nucleic Acids Research*, 35(19), 6588-6597. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm741>

Ilves, I., Petojevic, T., Pesavento, J., & Botchan, M. (2010). Activation of the MCM2-7 Helicase by Association with Cdc45 and GINS Proteins. *Molecular Cell*, 37(2), 247-258. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.030>

Jacobson, E., Smith, J., Wielckens, K., Hilz, H., & Jacobson, M. (1985). Cellular recovery of dividing and confluent C3H10T1/2 cells from N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the presence of ADP ribosylation inhibitors. *Carcinogenesis*, 6(5), 715-718. <https://doi.org/10.1093/carcin/6.5.715>

- Javle, M., & Curtin, N. (2011). The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation. *British Journal of Cancer*, *105*(8), 1114-1122. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.382>
- Jiang, H., Reinhardt, H., Bartkova, J., Tommiska, J., Blomqvist, C., Nevanlinna, H., Bartek, J., Yaffe, M., & Hemann, M. (2009). The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response. *Genes & Development*, *23*(16), 1895-1909. <https://doi.org/10.1101/gad.1815309>
- Johansson, E., & Dixon, N. (2013). Replicative DNA Polymerases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(6), a012799-a012799. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012799>
- Juarez-Salinas, H., Sims, J., & Jacobson, M. (1979). Poly(ADP-ribose) levels in carcinogen-treated cells. *Nature*, *282*(5740), 740-741. <https://doi.org/10.1038/282740a0>
- Jubin, T., Kadam, A., Jariwala, M., Bhatt, S., Sutariya, S., Gani, A., Gautam, S., & Begum, R. (2016). The PARP family: insights into functional aspects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cell growth and survival. *Cell Proliferation*, *49*(4), 421-437. <https://doi.org/10.1111/cpr.12268>
- Jubin, T., Kadam, A., Jariwala, M., Bhatt, S., Sutariya, S., Gani, A., Gautam, S., & Begum, R. (2016). The PARP family ADP -ribose) polymerase-1 in cell growth and survival: insights into functional aspects of poly (ADP -ribose) polymerase-1 in cell growth and survival. *Cell Proliferation*, *49*(4), 421-437. <https://doi.org/10.1111/cpr.12268>
- Kaguni, J. (2011). Replication initiation at the Escherichia coli chromosomal origin. *Current Opinion in Chemical Biology*, *15*(5), 606-613. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.07.016>
- Kamaletdinova, T., Fanaei-Kahrani, Z., & Wang, Z. (2019). The Enigmatic Function of PARP1: From PARylation Activity to PAR Readers. *Cells*, *8*(12). <https://doi.org/10.3390/cells8121625>
- Kang, Z., Fu, P., Alcivar, A., Fu, H., Redon, C., Foo, T., Zuo, Y., Ye, C., Baxley, R., Madireddy, A., Buisson, R., Bielinsky, A., Zou, L., Shen, Z., Aladjem, M., & Xia, B. (2021). BRCA2 associates with MCM10 to suppress PRIMPOL-mediated repriming and single-stranded gap formation after DNA damage. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26227-6>
- Kaufman, B., Shapira-Frommer, R., Schmutzler, R., Audeh, M., Friedlander, M., Balmaña, J., Mitchell, G., Fried, G., Stemmer, S., Hubert, A., Rosengarten, O., Steiner, M., Loman, N., Bowen, K., Fielding, A., & Domchek, S. (2015). Olaparib Monotherapy in Patients With Advanced Cancer and a Germline BRCA1/2 Mutation. *Journal of Clinical Oncology*, *33*(3), 244-250. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.2728>
- Klinge, S., Núñez-Ramírez, R., Llorca, O., & Pellegrini, L. (2009). 3D architecture of DNA Pol α reveals the functional core of multi-subunit replicative polymerases. *The EMBO Journal*, *28*(13), 1978-1987. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.150>
- Kuriyan, J., & O'Donnell, M. (1993). Sliding Clamps of DNA Polymerases. *Journal of Molecular Biology*, *234*(4), 915-925. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1644>
- Leonard, A., & Mechali, M. (2013). DNA Replication Origins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(10), a010116-a010116. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010116>

- Leung, W., Simoneau, A., Saxena, S., Jackson, J., Patel, P., Limbu, M., Vindigni, A., & Zou, L. (2023). ATR protects ongoing and newly assembled DNA replication forks through distinct mechanisms. *Cell Reports*, *42*(7). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112792>
- Lieber, M. (2008). The Mechanism of Human Nonhomologous DNA End Joining. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(1), 1-5. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700039200>
- Lisby, M., Barlow, J., Burgess, R., & Rothstein, R. (2004). Choreography of the DNA Damage Response. *Cell*, *118*(6), 699-713. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.015>
- Li, X., & Heyer, W. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*, *18*(1), 99-113. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.1>
- Lord, C., & Ashworth, A. (2016). BRCAness revisited. *Nature Reviews Cancer*, *16*(2), 110-120. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.21>
- Maga, G., Stucki, M., Spadari, S., & Hübscher, U. (2000). DNA polymerase switching: I. Replication factor C displaces DNA polymerase α prior to PCNA loading. *Journal of Molecular Biology*, *295*(4), 791-801. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3394>
- Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., & Oda, M. (2010). Eukaryotic Chromosome DNA Replication: Where, When, and How?. *Annual Review of Biochemistry*, *79*(1), 89-130. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.103205>
- Maya-Mendoza, A., Moudry, P., Merchut-Maya, J., Lee, M., Strauss, R., & Bartek, J. (2018). High speed of fork progression induces DNA replication stress and genomic instability. *Nature*, *559*(7713), 279-284. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0261-5>
- Mazouzi, A., Velimezi, G., & Loizou, J. (2014). DNA replication stress: Causes, resolution and disease. *Experimental Cell Research*, *329*(1), 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.09.030>
- McCabe, N., Turner, N., Lord, C., Kluzek, K., Bialkowska, A., Swift, S., Giavara, S., O'Connor, M., Tutt, A., Zdzienicka, M., Smith, G., & Ashworth, A. (2006). Deficiency in the Repair of DNA Damage by Homologous Recombination and Sensitivity to Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition. *Cancer Research*, *66*(16), 8109-8115. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0140>
- Mendel, G. (1865). Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Brünn, Czechoslovakia, Verlage des Vereines*, 3-47.
- Mersch, J., Jackson, M., Park, M., Nebgen, D., Peterson, S., Singletary, C., Arun, B., & Litton, J. (2015). Cancers associated with BRCA 1 and BRCA 2 mutations other than breast and ovarian. *Cancer*, *121*(2), 269-275. <https://doi.org/10.1002/cncr.29041>
- Meselson, M., & Stahl, F. (1958). The replication of DNA in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *44*(7), 671-682. <https://doi.org/10.1073/pnas.44.7.671>
- Mimitou, E., & Symington, L. (2009). Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends in Biochemical Sciences*, *34*(5), 264-272. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.01.010>

- Miyabe, I., Kunkel, T., Carr, A., & Copenhaver, G. (2011). The Major Roles of DNA Polymerases Epsilon and Delta at the Eukaryotic Replication Fork Are Evolutionarily Conserved. *PLoS Genetics*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002407>
- Morales, J., Li, L., Fattah, F., Dong, Y., Bey, E., Patel, M., Gao, J., & Boothman, D. (2014). Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of Action and Rationale for Targeting in Cancer and Other Diseases. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 24(1), 15-28. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2013006875>
- Moynahan, M., Chiu, J., Koller, B., & Jasin, M. (1999). Brca1 Controls Homology-Directed DNA Repair. *Molecular Cell*, 4(4), 511-518. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80202-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80202-6)
- Moynahan, M., & Jasin, M. (2010). Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(3), 196-207. <https://doi.org/10.1038/nrm2851>
- Murai, J., Huang, S., Das, B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshov, J., Ji, J., Takeda, S., & Pommier, Y. (2012). Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Research*, 72(21), 5588-5599. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2753>
- Muramatsu, S., Hirai, K., Tak, Y., Kamimura, Y., & Araki, H. (2010). CDK-dependent complex formation between replication proteins Dpb11, Sld2, Pol ϵ , and GINS in budding yeast. *Genes & Development*, 24(6), 602-612. <https://doi.org/10.1101/gad.1883410>
- Muzi-Falconi, M., Giannattasio, M., Foiani, M., & Plevani, P. (2003). The DNA Polymerase α -Primase Complex: Multiple Functions and Interactions. *The Scientific World JOURNAL*, 3, 21-33. <https://doi.org/10.1100/tsw.2003.05>
- Neelsen, K., & Lopes, M. (2015). Replication fork reversal in eukaryotes: from dead end to dynamic response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(4), 207-220. <https://doi.org/10.1038/nrm3935>
- O'Donnell, M., Langston, L., & Stillman, B. (2013). Principles and Concepts of DNA Replication in Bacteria, Archaea, and Eukarya. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(7), a010108-a010108. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010108>
- Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., & Sugino, A. (1968). Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 59(2), 598-605. <https://doi.org/10.1073/pnas.59.2.598>
- O'Neil, N., Bailey, M., & Hieter, P. (2017). Synthetic lethality and cancer. *Nature Reviews Genetics*, 18(10), 613-623. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.47>
- Panzarino, N., Kraiss, J., Cong, K., Peng, M., Mosqueda, M., Nayak, S., Bond, S., Calvo, J., Doshi, M., Bere, M., Ou, J., Deng, B., Zhu, L., Johnson, N., & Cantor, S. (2021). Replication Gaps Underlie BRCA Deficiency and Therapy Response. *Cancer Research*, 81(5), 1388-1397. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-1602>

- Pâques, F., & Haber, J. (1999). Multiple Pathways of Recombination Induced by Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 349-404. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.2.349-404.1999>
- Parker, R., Eastman, A., Bostick-Bruton, F., & Reed, E. (1991). Acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells is associated with enhanced repair of cisplatin-DNA lesions and reduced drug accumulation. *Journal of Clinical Investigation*, 87(3), 772-777. <https://doi.org/10.1172/JCI115080>
- Pastink, A., Eeken, J., & Lohman, P. (2001). Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 480-481, 37-50. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00167-1](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00167-1)
- Pavlov, Y., Frahm, C., McElhinny, S., Niimi, A., Suzuki, M., & Kunkel, T. (2006). Evidence that Errors Made by DNA Polymerase α are Corrected by DNA Polymerase δ . *Current Biology*, 16(2), 202-207. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.12.002>
- Perez-Arnaiz, P., Bruck, I., & Kaplan, D. (2016). Mcm10 coordinates the timely assembly and activation of the replication fork helicase. *Nucleic Acids Research*, 44(1), 315-329. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1260>
- Poirier, G., de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Niedergang, C., & Mandel, P. (1982). Poly(ADP-ribose)ylation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(11), 3423-3427. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.11.3423>
- Quinet, A., Tirman, S., Jackson, J., Šviković, S., Lemaçon, D., Carvajal-Maldonado, D., González-Acosta, D., Vessoni, A., Cybulla, E., Wood, M., Tavis, S., Batista, L., Méndez, J., Sale, J., & Vindigni, A. (2020). PRIMPOL-Mediated Adaptive Response Suppresses Replication Fork Reversal in BRCA-Deficient Cells. *Molecular Cell*, 77(3), 461-474.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.008>
- Ragupathi, A., Singh, M., Perez, A., & Zhang, D. (2023). Targeting the BRCA1/2 deficient cancer with PARP inhibitors: Clinical outcomes and mechanistic insights. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1133472>
- Rosenberg, B., Vancamp, L., Trosko, J., & Mansour, V. (1969). Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature*, 222(5191), 385-386. <https://doi.org/10.1038/222385a0>
- Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L., & Lübrich, M. (2003). Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle. *Molecular and Cellular Biology*, 23(16), 5706-5715. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.16.5706-5715.2003>
- Samson, R., & Bell, S. (2011). Cell cycles and cell division in the archaea. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 350-356. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.005>
- Shen, Y., Aoyagi-Scharber, M., & Wang, B. (2015). Trapping Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 353(3), 446-457. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.222448>

- Schlacher, K., Wu, H., & Jasin, M. (2012). A Distinct Replication Fork Protection Pathway Connects Fanconi Anemia Tumor Suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell*, 22(1), 106-116. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.015>
- Schreiber, V., Hunting, D., Trucco, C., Gowans, B., Grunwald, D., De Murcia, G., & De Murcia, J. (1995). A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(11), 4753-4757. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.4753>
- Simoneau, A., Xiong, R., & Zou, L. (2021). The trans cell cycle effects of PARP inhibitors underlie their selectivity toward BRCA1/2-deficient cells. *Genes & Development*, 35(17-18), 1271-1289. <https://doi.org/10.1101/gad.348479.121>
- Skidmore, C., Davies, M., Goodwin, P., Halldorsson, H., Lewis, P., Shall, S., & Zia'ee, A. (1979). The Involvement of Poly(ADP-ribose) Polymerase in the Degradation of NAD Caused by gamma-Radiation and N-Methyl-N-Nitrosourea. *European Journal of Biochemistry*, 101(1), 135-142. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb04225.x>
- Smith, S., Easton, D., Evans, D., & Ponder, B. (1992). Allele losses in the region 17q12-21 in familial breast and ovarian cancer involve the wild-type chromosome. *Nature Genetics*, 2(2), 128-131. <https://doi.org/10.1038/ng1092-128>
- Snustad, D., & J. Simmons, M. (2017). *Genetika* (druhé aktualizované vydání). Brno, Masarykova Univerzita.
- Somyajit, K., Spies, J., Coscia, F., Kirik, U., Rask, M., Lee, J., Neelsen, K., Mund, A., Jensen, L., Paull, T., Mann, M., & Lukas, J. (2021). Homology-directed repair protects the replicating genome from metabolic assaults. *Developmental Cell*, 56(4), 461-477.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.01.011>
- Stillman, B. (2005). Origin recognition and the chromosome cycle. *FEBS Letters*, 579(4), 877-884. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.011>
- Sun, J., Kawakami, H., Zech, J., Speck, C., Stillman, B., & Li, H. (2012). Cdc6-Induced Conformational Changes in ORC Bound to Origin DNA Revealed by Cryo-Electron Microscopy. *Structure*, 20(3), 534-544. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.01.011>
- Symington, L., Rothstein, R., & Lisby, M. (2014). Mechanisms and Regulation of Mitotic Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 198(3), 795-835. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.166140>
- Talens, F., Jalving, M., Gietema, J., & Van Vugt, M. (2017). Therapeutic targeting and patient selection for cancers with homologous recombination defects. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(6), 565-581. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1322061>
- Thakar, T., & Moldovan, G. (2021). The emerging determinants of replication fork stability. *Nucleic Acids Research*, 49(13), 7224-7238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab344>

Ticau, S., Friedman, L., Ivica, N., Gelles, J., & Bell, S. (2015). Single-Molecule Studies of Origin Licensing Reveal Mechanisms Ensuring Bidirectional Helicase Loading. *Cell*, *161*(3), 513-525. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.012>

Timms, K., Abkevich, V., Hughes, E., Neff, C., Reid, J., Morris, B., Kalva, S., Potter, J., Tran, T., Chen, J., Iliev, D., Sangale, Z., Tikishvili, E., Perry, M., Zharkikh, A., Gutin, A., & Lanchbury, J. (2014). Association of BRCA1/2 defects with genomic scores predictive of DNA damage repair deficiency among breast cancer subtypes. *Breast Cancer Research*, *16*(6). <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0475-x>

Tsurimoto, T., Melendy, T., & Stillman, B. (1990). Sequential initiation of lagging and leading strand synthesis by two different polymerase complexes at the SV40 DNA replication origin. *Nature*, *346*(6284), 534-539. <https://doi.org/10.1038/346534a0>

Tsurimoto, T., & Stillman, B. (1991). Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. II. Switching of DNA polymerase alpha and delta during initiation of leading and lagging strand synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(3), 1961-1968. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)52386-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)52386-3)

Turk, A., & Wisinski, K. (2018). PARP inhibitors in breast cancer: Bringing synthetic lethality to the bedside. *Cancer*, *124*(12), 2498-2506. <https://doi.org/10.1002/cncr.31307>

Ubhi, T., & Brown, G. (2019). Exploiting DNA Replication Stress for Cancer Treatment. *Cancer Research*, *79*(8), 1730-1739. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3631>

Vaitsiankova, A., Burdova, K., Sobol, M., Gautam, A., Benada, O., Hanzlikova, H., & Caldecott, K. (2022). PARP inhibition impedes the maturation of nascent DNA strands during DNA replication. *Nature Structural & Molecular Biology*, *29*(4), 329-338. <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00747-1>

van Wietmarschen, N., & Nussenzweig, A. (2018). Mechanism for Synthetic Lethality in BRCA-Deficient Cancers: No Longer Lagging Behind. *Molecular Cell*, *71*(6), 877-878. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.045>

Waga, S., & Stillman, B. (1994). Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. *Nature*, *369*(6477), 207-212. <https://doi.org/10.1038/369207a0>

Watson, J., & Crick, F. (1953). THE STRUCTURE OF DNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *18*(0), 123-131. <https://doi.org/10.1101/SQB.1953.018.01.020>

Watson, J., & Crick, F. (1953). Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid. *Nature*, *171*(4361), 964-967. <https://doi.org/10.1038/171964b0>

Weber, G. (2015). DNA Damaging Drugs. In *Molecular Therapies of Cancer* (pp. 9-112). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13278-5_2

Wilkins, M., Stokes, A., & Wilson, H. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids. *Nature*, *171*(4356), 738-740. <https://doi.org/10.1038/171738a0>

Wold, M. (1997). REPLICATION PROTEIN A: A Heterotrimeric, Single-Stranded DNA-Binding Protein Required for Eukaryotic DNA Metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 66(1), 61-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.61>

Wong, R., Petriukov, K., & Ulrich, H. (2021). Daughter-strand gaps in DNA replication – substrates of lesion processing and initiators of distress signalling. *DNA Repair*, 105. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103163>

Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., Micklem, G., Barfoot, R., Hamoudi, R., Patel, S., Rices, C., Biggs, P., Hashim, Y., Smith, A., Connor, F., Arason, A. et al. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, 378(6559), 789-792. <https://doi.org/10.1038/378789a0>

Wooster, R., Neuhausen, S., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D., Fields, P., Marshall, G., Narod, S., Lenoir, G., Lynch, H., Feunteun, J., Devilee, P., Cornelisse, C., Menko, F. et al. (1994). Localization of a Breast Cancer Susceptibility Gene, BRCA2, to Chromosome 13q12-13. *Science*, 265(5181), 2088-2090. <https://doi.org/10.1126/science.8091231>

Yoshida, K., & Miki, Y. (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science*, 95(11), 866-871. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb02195.x>

Zellweger, R., Dalcher, D., Mutreja, K., Berti, M., Schmid, J., Herrador, R., Vindigni, A., & Lopes, M. (2015). Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *Journal of Cell Biology*, 208(5), 563-579. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406099>

Zeman, M., & Cimprich, K. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nature Cell Biology*, 16(1), 2-9. <https://doi.org/10.1038/ncb2897>

Zimmermann, M., Murina, O., Reijns, M., Agathangelou, A., Challis, R., Tarnauskaitė, Ž., Muir, M., Fluteau, A., Aregger, M., McEwan, A., Yuan, W., Clarke, M., Lambros, M., Paneesha, S., Moss, P., Chandrashekar, M., Angers, S., Moffat, J., Brunton, V. et al. (2018). CRISPR screens identify genomic ribonucleotides as a source of PARP-trapping lesions. *Nature*, 559(7713), 285-289. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0291-z>

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: (A) Reprezentativní schéma značení templátové a nascentní DNA prostřednictvím CldU. (B) Reprezentativní schéma expozice templátového a nascentního vlákna DNA pro určení pozice vzniku jednovláknových DNA mezer po ovlivnění olaparibem na templátovém nebo nascentním vlákne DNA vizualizovaných pomocí anti-CldU protilátky. Převzato a upraveno podle (Leung et al., 2023). 34

Obrázek 2: (A) Graf znázorňující intenzitu detekovaného CldU signálu odpovídajícího jednovláknovým DNA mezerám lokalizovaných na nascentním vlákne DNA při zaznačení templátového vlákna DNA po různých časových intervalech (2, 4, 6, 8 hodin + 16 h přes noc) inkubace buněčné linie U2OS s olaparibem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty naměřené intenzity signálu CldU a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD). (B) Reprezentativní obrázky buněčné linie U2OS pořízené pomocí skenovacího mikroskopu Olympus ScanR při zvětšení 40x v suchém prostředí. Jednotlivé obrázky zobrazují detekovaný CldU signál (zeleně), který odpovídá jednovláknovým DNA mezerám lokalizovaných na nascentním vlákne DNA při zaznačení templátového vlákna DNA. Modře jsou zobrazena jádra jednotlivých buněk díky fluorescenčnímu barvivu DAPI. Buňky byly ošetřeny pseudobází CldU po dobu 48 hodin a následně ošetřeny olaparibem po dobu různých časových intervalů (2, 4, 6, 8 hodin + 16 h přes noc). Buňky byly vizualizovány pomocí anti-CldU protilátky. 35

Obrázek 3: (A) Graf znázorňující intenzitu detekovaného CldU signálu odpovídajícího jednovláknovým DNA mezerám lokalizovaných na templátovém vlákne DNA při zaznačení nascentního vlákna DNA po různých časových intervalech (2, 4, 6, 8 hodin + 16 h přes noc) inkubace buněčné linie U2OS s olaparibem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty naměřené intenzity signálu CldU a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD). (B) Reprezentativní obrázky buněčné linie U2OS pořízené pomocí skenovacího mikroskopu Olympus ScanR při zvětšení 40x v suchém prostředí. Jednotlivé obrázky zobrazují detekovaný CldU signál (zeleně), který odpovídá jednovláknovým DNA mezerám lokalizovaných na templátovém vlákne DNA při zaznačení nascentního vlákna DNA. Modře jsou zobrazena jádra jednotlivých buněk díky fluorescenčnímu barvivu DAPI. Buňky byly ošetřeny pseudobází CldU o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ v kombinaci s olaparibem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ po dobu různých časových intervalů (2, 4, 6, 8 hodin + 16 h přes noc). Buňky byly vizualizovány pomocí anti-CldU protilátky. 36

Obrázek 4: (A) Graf znázorňující průměrnou intenzitu detekovaného CldU signálu po umlčení polymerázy PRIMPOL. (B) Graf znázorňující průměrnou intenzitu detekovaného CldU signálu po inhibici faktorů podílejících se na zpracování Okazaki fragmentů (FEN1, LIG1, DNA2) pomocí inhibitorů FEN1i, LIG1i, DNA2i o koncentracích 10 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 16 hodin inkubace v růstovém inkubátoru při 37 °C s 5 % oxidu uhličitého. Modře jsou zde znázorněny intenzity signálu CldU detekovaného u buněčné linie U2OS bez ovlivnění olaparibem. Černě jsou zde znázorněny intenzity

signálu CldU u buněčné linie U2OS, která byla ovlivněna olaparibem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 16 hodin. Červeně je vyznačena průměrná hodnota intenzity signálu CldU. 37

Obrázek 5: (A) Graf znázorňující průměrnou intenzitu detekovaného CldU signálu po inhibici MRE11 pomocí inhibitoru mirin o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 16 hodin inkubace. (B) Graf znázorňující průměrnou intenzitu detekovaného CldU signálu po inhibici MRE11 pomocí inhibitoru PFM01 o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 16 hodin inkubace. Modře jsou zde znázorněny intenzity signálu CldU detekovaného u buněčné linie U2OS bez ovlivnění olaparibem. Černě jsou zde znázorněny intenzity signálu CldU u buněčné linie U2OS, která byla ovlivněna olaparibem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 16 hodin. Červeně je vyznačena průměrná hodnota intenzity signálu CldU. 38

Obrázek 6: (A) Graf znázorňující intenzitu detekovaného signálu CldU po umlčení esenciálních nukleáz MRE11, EXO1 a rozpoznávacího faktoru dvouvláknových zlomů CtiP. Umlčení bylo provedeno pomocí siRNA interference. Bíle je zde znázorněno umlčení faktorů MRE11, EXO1 a CtiP u buněčné linie U2OS bez ovlivnění olaparibem. Černě je zde znázorněno umlčení faktorů MRE11, EXO1 a CtiP u buněčné linie U2OS, která byla ovlivněna olaparibem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 16 hodin. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty naměřené intenzity signálu CldU a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD). (B) Reprezentativní obrázky buněčné linie U2OS pořízené pomocí skenovacího mikroskopu Olympus ScanR při zvětšení 40x v suchém prostředí. Jednotlivé obrázky zobrazují detekovaný CldU signál (zeleně), po umlčení faktorů MRE11, EXO1 a CtiP bez olaparibu (nahore) a s olaparibem o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 16 hodin inkubace (dole). Modře jsou zobrazena jádra jednotlivých buněk díky fluorescenčnímu barvivu DAPI. 39