

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2017

Petra Kremserová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Inhibice signálních drah odpovědi
buněk na poškození DNA jako
možnost léčby rakoviny**

Bakalářská práce

Petra Kremserová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: Mgr. Ján Gurský, Ph.D.

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury a pod vedením Mgr. Jána Gurského, Ph.D.“

V Olomouci dne

Podpis.....

Tímto bych chtěla velice poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Jánu Gurskému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a poskytnuté materiály, ale především za ochotu a čas, který mi při zpracování této bakalářské práce věnoval. V neposlední řadě patří poděkování také celému týmu Laboratoře integrity genomu na Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za umožnění zpracování této práce.

Souhrn

Buňky každého organismu a jejich DNA jsou neustále zasahovány vlivy jak endogenními, tak exogenními, které mají neblahé účinky na jejich životaschopnost. Efekty těchto vlivů jsou především detekovatelné ve formě narušení integrity genetické informace a bylo tedy nutné vyvinout způsob, který by byl účinným obranným systémem schopným takovéto poškození napravit a eliminovat jeho důsledky. Nástrojem jsou zde komplexní signální dráhy a způsoby opravy, kterými disponují nejen buňky zdravé tkáně, ale v určitých obměnách také buňky tkáně nádorové, které ovšem vykazují vysokou míru replikačního stresu a tak zde nejsou výše popsané strategie tak účinné.

Teoretická část této práce je věnována obecnému přehledu typů poškození DNA, drah signalizace a cest opravy tohoto poškození. Experimentální část se věnuje otázce, zda inhibice některých signálních drah odpovědi buněk na replikační stres má efekt na jejich viabilitu, jak silný tento efekt a také jeho srovnání s efektem u buněčných linií nenádorových. Také je zde otestována možnost synergistického vztahu inhibitorů Chk1i a Mk2i při ovlivnění leukemických buněčných linií, který byl u jistých buněčných linií prezentován ve studii Dietleina a kolektivu (*Dietlein et al., 2015*). Výsledky hovoří o vysoké účinnosti inhibitoru Chk1i a kombinace inhibitorů Chk/Mk2i u nádorových linií, přičemž u buněčných linií nenádorových byla účinnost výrazně nižší. V případě kombinace Chk1i a Mk2i se vždy ukázal inhibitor Chk1i jako ten, jež zapříčiňuje většinu efektu inhibice a Mk2i zde měl spíše aditivní účinek. Znamená to tedy, že strategie inhibice drah odpovědi buněk na replikační stres, jehož jedna z příčin je poškození DNA, je slibnou oblastí ve výzkumu zabývajícím se vývojem nových léčebných metod leukemických onemocnění.

Summary

Cells and especially their DNA are constant targets of both endogenic and exogenic influences resulting with unfortunate effects as far as over all functioning of cell, tissue and organism is concerned. These effects can be seen specifically as a disruption of genomic integrity and stability. Therefore it was necessary for cells to develop a way to defend their genetic information and make sure, that it will stay intact as much as possible. Complex signalling pathways and ways to repair damaged DNA were created to fulfil this task. However these signalling pathways and ways of repair are not only active in healthy tissue but with some differences in cancer tissue as well.

Theoretical part summarizes known facts about types of DNA damage, signalling pathways and ways of repair. Experimental part focuses on a possibility that inhibition of some of the signalling pathways is a strong influencer of cancer cells viability. Furthermore it provides a comparison between the effect of inhibition in cancer and non-cancer cells. The experimental part is also aimed at testing the possibility of synergic effect when the combination of Chk1i/Mk2i is used for treating leukemic cell lines. The results are showing, that Chk1i inhibitor and combination of Chk1i/Mk2i are very efficient killers of cancer cells, while non-cancer cells are not at all affected so heavily. In case of combination Chk1i/Mk2i the Chk1i was always the one causing the majority of effect, while Mk2i provided rather additive effect. It is clear, that this strategy of inhibiting some of the pathways of cellular response to replication stress caused mainly by DNA damage is a promising area of research focused on development of new methods to cure leukemic diseases.

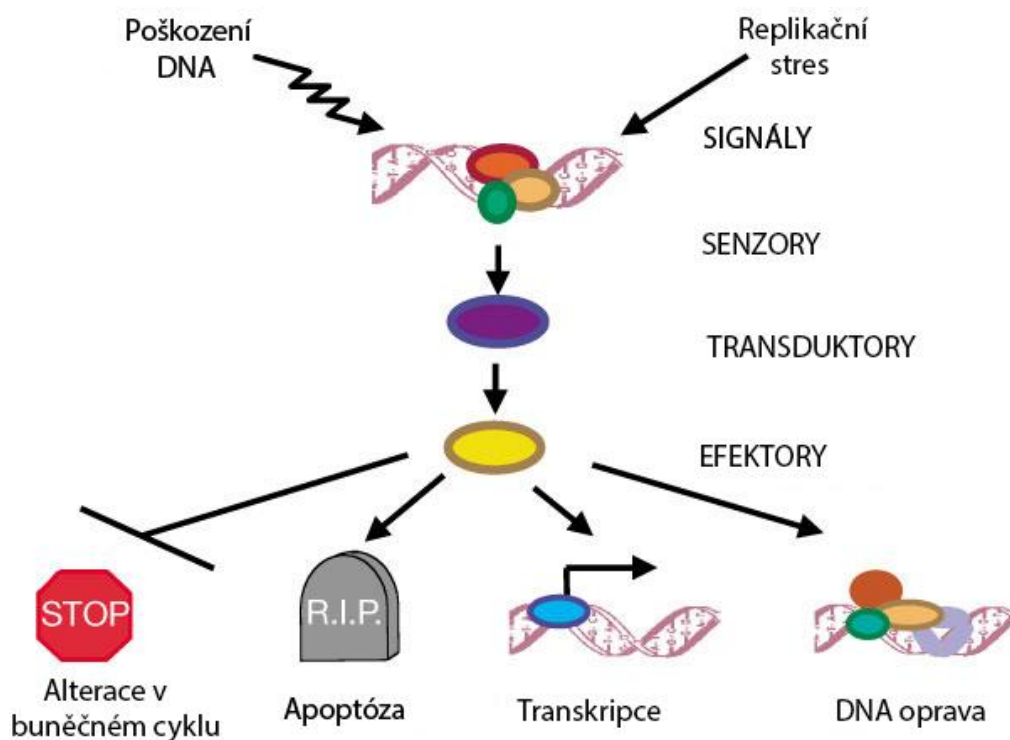
Obsah

1.	Úvod	9
2	Současný stav řešené problematiky	11
2.1	Poškození DNA	11
2.1.1	DNA léze způsobené exogenním činitelem	11
2.1.2	Endogenní poškození molekuly DNA.....	12
2.1.2.1	<i>Oxidativní poškození</i>	12
2.1.2.2	<i>Změny struktury dusíkatých bází</i>	14
2.1.2.3	<i>Spontánní deaminace cytosinu na uracil</i>	15
2.1.2.4	<i>Deaminace purinových dusíkatých bází a ztráta báze</i>	15
2.2	Replikační stres	16
2.3	Genomická nestabilita	19
2.3.1	Snaha o udržení genomické integrity	19
2.4	Dráhy odpovědi buněk na poškození DNA (DDR).....	20
2.4.1	Oprava nesprávného párování bází a vystřížení nestandardní báze	20
2.4.2	Vystřížení nesprávného nukleotidu	21
2.4.3	Homologní rekombinace a spojování nehomologních konců	21
2.4.3.1	<i>Homologní rekombinace</i>	22
2.4.3.2	<i>Spojování nehomologních konců</i>	22
2.5	Signální molekuly drah odpovědi buněk na poškození DNA	23
2.5.1	ATR, ATM, Chk1, Chk2 signalizace	23
2.5.2	Poly(ADP-ribóza)polymeráza 1 a 2	25
2.5.3	Apoptóza a senescence	26
2.5.4	Aktivace imunitního systému a zánětlivé procesy	27
2.6	Rakovinná onemocnění, poškození DNA a DDR	29
2.6.1	Protein p53	29
2.6.2	Další onemocnění spojená s akumulací DNA lézí	30
2.7	Možnost využití inhibice DDR v léčbě rakoviny	31
3	Cíl práce.....	35
4	Materiál a metody	36
4.1	Materiál.....	36
4.1.1	Pomůcky a vybavení	36
4.1.2	Chemikálie a roztoky	36
4.1.3	Buněčné linie.....	37

4.1.3.1	<i>MII-ENL-ERtm</i> myší buněčná linie.....	37
4.1.3.2	Buněčné linie CEM a K562.....	37
4.1.3.2	Kontrolní buněčné linie.....	37
4.2	Metody.....	38
4.2.1	Rozmraz a kultivace suspenzních a adherentních buněčných linií.....	38
4.2.1.1.	Příprava média.....	39
4.2.2.	Nasazení buněk a ovlivnění inhibitory.....	39
4.2.3	Příprava fluorescenčního preparátu (cytopsine) a fluorescenční mikroskopie.....	44
4.2.4	Analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie.....	45
5	Výsledky.....	47
5.1	Analýza výsledků ovlivnění MII-ENL-ERtm myší buněčné linie.....	47
5.2	Potvrzení přítomnosti poškozené DNA u buněk linie MII-ENL-ERtm (MEERtm)...	52
5.3	Procentuální zastoupení subG1 u MEERtm ovlivněných jednotlivými inhibitory a rozložení buněk ve fázích buněčného cyklu.....	54
5.4	Analýza výsledků ovlivnění buněčných linií odvozených z buněk leukemické tkáně .	56
6	Diskuze.....	65
7	Závěr.....	67
8	Seznam zkratk.....	68
9	Literatura.....	71

1. Úvod

Rakovinná onemocnění patří k chorobám s vysokou frekvencí výskytu v populaci a vysokou úmrtností postižených osob. Tento fakt vede také k tomu, že velká část vědeckého výzkumu se věnuje právě problematice léčby různých typů rakoviny. Základ léčebných postupů používaných v bojích s těmito chorobami leží ve využití kombinace ionizujícího záření a vhodných chemických látek, jejichž použití předchází ve vysokém procentu případů chirurgický zákrok. Účinek ionizujícího záření a vybraných chemických látek ve své podstatě spočívá v narušení dvoušroubovicové struktury DNA, přičemž je klíčové tento účinek co nejvíce soustředit na nádorové buňky tak, aby byly co nejméně zasaženy ostatní buňky organismu ((Jackson, S.P., Bartek,,J., 2009, Lord, J. Ashworth, A., 2012).



Obrázek 1: Shrnutí osudu buněk s funkčně defektní DNA. Pokud je DNA buňky zasažena nepříznivými ději, jsou přes signální dráhy uvedeny v činnosti systémy buněčné odpovědi. Tyto systémy jsou schopny ovlivnit chod buněčného cyklu, DNA lézi opravit, iniciovat apoptózu, pokud je léze neopravitelná, či zajistit dokončení transkripce (Upraveno dle Elledge, S.J., Zhou, B. S., 2000).

Poškození molekuly DNA je velice častým jevem postihujícím všechny buňky. Ovšem jedná se o jev nežádoucí, neboť udržovat integritu genetické informace je

nezbytné pro zachování správného fungování buňky a v důsledku i celého organismu. Za tímto účelem byl vyvinut tzv. systém odpovědi buněk na poškození DNA (DNA damage response – DDR). Tento systém se sestává ze signálních drah zajišťujících celý proces opravy poškozené DNA od prvotní molekuly signalizující výskyt poškození až po konečný proces, který buď lézi opraví, má apoptický účinek, nebo pošle buňku do senescence (*Jackson, S.P., Bartek, J., 2009, Lord, J. Ashworth, A., 2012*).

Možným jevem snižujícím účinnost terapií využívaných v léčbě rakovinných onemocnění se tedy ukazuje být snaha DDR opravovat léze DNA nádorových buněk, jež jsou obvykle účinným prvkem probíhající léčebné terapie. V návaznosti na popsany problém je v současnosti diskutována teorie o možnosti účinku blokace vybraných signálních drah na účinnost ozařování a chemoterapie při léčbě rakovinných onemocnění (*Lord, J. Ashworth, A., 2012, Johnson, N. et al., 2011*).

V praktické části práce budou provedeny buněčné eseje zkoumající účinek Chk1i, Mki2i a Parpi inhibitoru signálních drah odpovědi buněk na poškození DNA a jejich kombinací na viabilitu nádorové buněčné linie v porovnání s buněčnou linií nenádorovou. Z výsledků porovnávajících zkoumané buněčné linie budou poté vyvozeny závěry o možnostech uplatnění v léčebných terapiích nádorových onemocnění.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Poškození DNA

DNA jako taková je bez přestání vystavována jak endogennímu poškození, tak množství exogenních agens způsobujících její poškození. Tento jev se v každé buňce organismu uplatňuje v četnosti desítek tisíc lézí za den. Výzkumy v předmětné oblasti poskytly náhled na nejčastější endogenní procesy a identifikovaly velké množství exogenních agens, která jsou příčinou změny sekvencí DNA či následných mutací, a tak mění nebo poškozují genetickou informaci. Mezi nejznámější z těchto agens patří ionizující záření, ultrafialová složka slunečního záření, cigaretový kouř, chemikálie využívané v průmyslu či látky využívané v chemoterapii při léčbě rakoviny (*Jackson, S.P., Bartek, J., 2009, Lord, J. Ashworth, A., 2012*).

2.1.1 DNA léze způsobené exogenním činitelem

Typy lézí postihujících genetickou informaci organismů mohou být různé a do jisté míry jsou závislé na agens, jehož činnosti jsou výsledkem. Ionizující záření je známým spouštěcím mechanismem pro vznik jednovláknových či posléze dvouvláknových zlomů, přičemž dvouvláknové zlomy mají dalekosáhlejší důsledky. Ultrafialová složka slunečního záření dopadající na Zemi je příčinou až 1×10^5 lézí v buňce za den. Většinou jsou zasaženy dusíkaté báze v dvoušroubovici DNA a léze jsou nejčastěji představovány cyklobutan - pyrimidinovými dimery, které mohou vyústit ve změnu sekvence DNA. Například pokud je součástí dimeru cytosin, náchylnější k deaminaci, je během několika dalších buněčných dělení nahrazen thyminem (*Lord, J. Ashworth, A., 2012*).

Látky nacházející se v životním prostředí organismů a také látky využívající se k léčbě rakoviny jsou dalšími entitami, které svou činností poškozují genetickou informaci zasaženého organismu a takto přispívají k maligní transformaci buněk. Mezi karcinogenní činitele v této kategorii lze zařadit látky, jejichž strukturní součástí je benzenový kruh. Jedná se tedy o chemické sloučeniny aromatické a mezi takovéto látky s karcinogenním řadíme například benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE) či benzoaminy, jejichž příkladem je N-acetoxy-2-aminofluoren (AAF). Dále je zde možno jmenovat látky s obsahem arsenu, azbestové materiály či formaldehyd. Na

konkrétním příkladu poslední zmiňované látky je vhodné uvést možné typy poškození DNA organismu exponovaného této látky. Polymerní sloučeniny, jejichž monomerní jednotkou je formaldehyd je možno detekovat v nejrůznějších produktech využívaných průmyslem, medicínskými zařízeními či domácnostmi. Monomerní jednotka těchto polymerů je vysoce reaktivní, zasahuje buněčné struktury a je činitelem při vzniku lézí. Nejčastěji se zde jedná o aberantní spojení mezi DNA a proteinem či dvěma proteiny. (Choi Jun-Hyuk et al, 2015). Jednou z nejčastějších chemických látek užívaných v chemoterapii cílící na nádorové tkáně jsou soli s obsahem platiny, konkrétně cisplatina. Obecným efektem těchto látek na molekulu DNA jsou tzv křížové vazby, které jsou pozorovány buď mezi vlákny či na vlákně jediném (Lord, J. Ashworth, A., 2012).

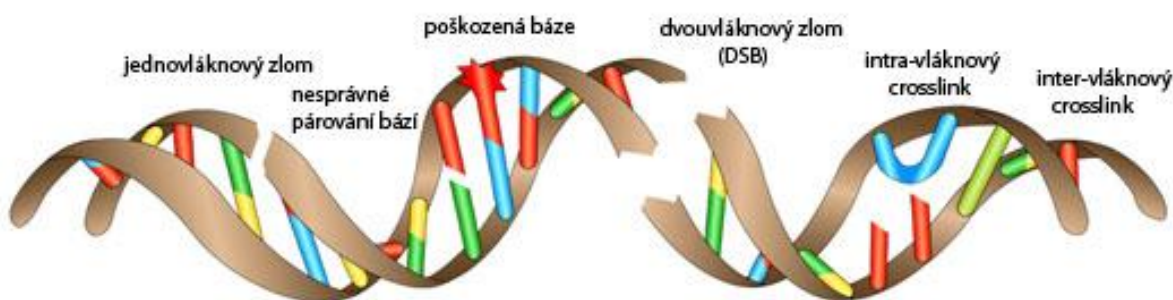
2.1.2 Endogenní poškození molekuly DNA

2.1.2.1 Oxidativní poškození

Velmi častým poškozením molekul DNA je poškození oxidativní. Tyto léze jsou způsobovány běžnými a všudypřítomnými volnými kyslíkovými radikály (ROS), které jsou produkovány veškerými aerobními procesy (Strand M. Janne et al., 2016). Kyslík ve svém stabilním stavu jako dvouatomová molekula má možnost do svých volných orbitálů přijmout volné elektrony a stává se tak superoxidovým radikálem O_2^* , peroxidem vodíku H_2O_2 či hydroxylovým radikálem $-OH^*$. ROS jsou produkovány exogenními agens nacházejícími se v životním prostředí zasažených organismů, z nichž některé byly zmíněny výše, a také endogenními procesy (Strand M.J., et al., 2016).

Endogenním zdrojem tohoto poškození genetické informace je každý metabolický proces v těle organismu, který produkuje reaktivní formu kyslíku. Jako konkrétní příklad je zde možno uvést elektrontransportní řetězec, čili proces redukce kyslíku na vodu při oxidativní fosforylaci probíhající v mitochondriích, či metabolismus probíhající v peroxizomech. H. J. H. Fenton v devadesátých letech 19. století podal důkaz o větší účinnosti peroxidu vodíku jako oxidativního činidla působícího na molekulu DNA, pokud je rozštěpen v reakci s železnatým kationtem. O této reakci dnes uvažujeme jako o Fentonově. Exogenní agens produkující ROS zahrnují sloučeniny redoxních cyklů, ionizující záření a některá léčiva (Henle, E.S. a Linn, S., 1997, Friedberg C. Errol, DNA Repair and Mutagenesis, second edition, 2006).

Mezi aberace způsobované na DNA nejčastěji působením volných kyslíkových radikálů patří poškození dusíkatých bází vedoucí k záměně, modifikace cukerné složky ribózy a v neposlední řadě jednovláknové a dvouvláknové zlomy či křížové vazby (*Strand M..J. et al., 2016*). Poškození dusíkatých bází spočívá v jejich ataku reaktivními radikály a následném zmnožení dvojných vazeb. V případě zasažení cukerné složky struktury DNA molekuly dochází ke ztrátě vodíku. Jisté závěry vedou k přesvědčení, že léze se na DNA objevují s určitou specifitou pro jednotlivé regiony. Více zasaženou oblastí DNA se ukazuje být méně kondenzovaný euchromatin, kde se nacházejí transkripčně aktivní geny oproti mnohonásobně více kondenzovanému heterochromatinu (*Strand M.J., et al., 2016, Friedberg C. Errol, DNA Repair and Mutagenesis, second edition, 2006*).



Obrázek 2: Možné typy poškození DNA. DNA neustále čelí působení mnohých druhů exogenních či endogenních agens, které stojí za vznikem poškození DNA, projevujícího se mnoha způsoby. (Upraveno dle <http://www.bioch.ox.ac.uk/aspsite/index.asp?pageid=892>, navštíveno dne 6. 3. 2017).

Jak bylo řečeno, oxidativní změny na molekule DNA jsou nežádoucí. Vzhledem k tomu, že volné kyslíkové radikály jsou všude přítomné, během evolučního vývoje bylo potřeba zajistit určitou ochranu genetické informace pro její esenciální roli ve vývoji organismu a zároveň velké zranitelnosti. Kromě cest opravy DNA, kterým se tato práce bude věnovat později, byly vyvinuty určité mechanismy a úpravy ve fyziologii, které přispívají k ochraně DNA a omezení účinnosti atakujících faktorů (*Friedberg C. Errol, DNA Repair and Mutagenesis, second edition, 2006*).

Ve fyziologii buňky se zde jedná především o její kompartmentaci, kdy molekula DNA nesoucí většinu genetické informace je situována v jádře buňky a je chráněna jadernou membránou. Kromě jaderné membrány je DNA uložena v jádře také

chráněna proteiny histonové a nehistonové povahy, které jsou součástí struktury DNA molekuly, a dále určitým stupněm kondenzace chromatinu. Ta ztěžuje přístup ROS. Podobně jsou uzavřeny do buněčných kompartmentů mitochondrie, chloroplastu a peroxizomu kyslíkové metabolické procesy oddělující tak tyto procesy od zbytku buňky a především od deoxyribonukleové kyseliny (Riley, P.A., 1994, Friedberg C. Errol, *DNA Repair and Mutagenesis, second edition, 2006*).

Dalším opatřením, které bylo přijato za účelem ochrany je navázání kovů přítomných v organismu a participujících na nejrůznějších fyziologických procesech na proteinové nosiče, znemožňující tak samovolnou činnost iontu. Příkladem zde může být ferritin či transferin, které uskladňují železnaté ionty přítomné v organismu. Takto je možné s ionty železa manipulovat pouze za předpokladu jejich uvolnění pomocí reduktázy, superoxidového radikálu či askorbátu (Proteggente, A.R, Rehman, A. et al., 2000).

Mezi opatření zavedená za účelem ochrany DNA molekuly před oxidativním poškozením patří také okamžité snížení koncentrace kyslíku po jeho vstupu do tkání z 20% obsažených ve vzduchu na konečnou koncentraci dosahující 3-4% kyslíku ve tkáních. Volné kyslíkové radikály jsou v organismu eliminovány také činností antioxidantů. Jsou známy antioxidanty, které se vyskytují v těle a eliminují reaktivní částice přítomné v organismu. Mezi přirozené antioxidanty patří například superoxid dismutázy, které jsou nejvíce zastoupeny, katalázy přítomny v peroxizomech či peroxidázy. Buňky mají také možnost reagovat na oxidativní poškození degradací poškozených struktur a jejich novou syntézou, pozastavením probíhajícího buněčného cyklu či jeho nasměrováním k apoptóze (Hornsby, P.J., 2003).

2.1.2.2 Změny struktury dusíkatých bází

Struktura DNA je neustále zasahována spontánními změnami a často jsou zasahovány dusíkaté báze tvořící důležitou součást molekuly. Jedná se zde o změnu chemického složení dusíkaté báze, která spočívá především v deaminaci bází původních, které se tímto transformují v jiné heterocyklické sloučeniny, což může vyústit v nastartování mutagenních procesů. Konkrétní změny, které lze v této oblasti jmenovat budou charakterizovány níže. Deaminace zasahuje ty dusíkaté báze, v jejichž chemické struktuře je přítomna aminoskupina. V případě DNA se tedy jedná o cytosin,

adenin, guanin a 5-methyl-cytosin, které se po ztrátě své aminoskupiny transformují na uracil, hypoxanthin, xanthin a thymin (*Lindahl, T., 1993*).

2.1.2.3 Spontánní deaminace cytosinu na uracil

Jedná se o nejčastější specifickou změnu v chemické struktuře DNA molekuly, neboť uracil v ní není běžně přítomen. Během evoluce byla RNA, jejíž chemické struktury je uracil pevnou součástí, nahrazena DNA. Tento evoluční krok se udál z důvodu větší stability DNA molekuly, která tímto poskytuje lepší ochranu genetické informací v ní obsažené. Náhrada molekuly RNA molekulou DNA byla provázena změnou v zastoupení dusíkatých bází v chemické struktuře této molekuly, kdy byl uracil nahrazen thyminem. Takto se uracil v DNA vyskytuje především jako výsledek deaminace cytosinu a jakákoli jeho přítomnost ve DNA organismu je tak identifikována jako nestandardní chemická struktura (*Poole, J.P., Dedon, P.C., 2001*).

Jsou známy dva mechanismy deaminační reakce. První z nich zahrnuje přímý útok hydroxylové skupiny na čtvrtou pozici pyrimidinového kruhu a druhý proces zahrnuje reakci skládající se z adice a eliminace, přičemž meziproduktem reakce je dihydrocytosin. Deaminace cytosinu je znásobována přítomností cyklobutan – pyrimidinových dimerů vzniklých působením ultrafialového záření, dále interkalačními látkami nebo pokud je cytosin párován s nesprávnou či alkylovanou dusíkatou bází (*Impellizzeri, K.J., Linn, S., 1991*).

Deaminace cytosinu na uracil je v několika případech prováděna enzymaticky a má svou roli v daném procesu. Jako příklad je možno uvést specializované editování RNA, kdy se jedná o deaminaci cytosinu při editaci mRNA. Dalším procesem je produkce protilátek v tělech obratlovců. Zde se jedná o kombinaci imunoglobulinových úseků kódovaných geny V, D a J pomocí nehomologního spojování konců (viz kapitola 4.3.2). Deaminace cytosinu je zaznamenána během procesu somatické hypermutace (*Poole, J.P., Dedon, P.C., 2001*).

2.1.2.4 Deaminace purinových dusíkatých bází a ztráta báze

Deaminace adeninu a guaninu je známa, ale objevuje se s mnohem nižší četností v porovnání s deaminací cytosinu. Adenin je v procesu deaminace přeměněn na hypoxanthin, zatímco guanin prochází deaminací za vzniku xanthinu. Deaminace zde probíhá při styku bází s látkou s kyselým pH, přičemž například adenin může být

deaminován pomocí kyseliny dusité. Hypoxanthin vzniklý v procesu deaminace je potenciálně mutagenní (*Friedberg C. Errol, DNA Repair and Mutagenesis, second edition, 2006*).

Ztráta báze je další ze spontánních endogenních poškození DNA. Jsou známy dva typy dle toho, zda je ztracená báze pyrimidinová, poté se jedná o depyrimidaci, či purinová, v tomto případě se jedná o depurinaci. K tomuto dochází povětšinou roztěpením N- glykosilové vazby ve struktuře DNA. Je totiž faktem, že po redukci ribózy na deoxyribózu došlo ke zvýšení náchylnosti cukerné složky molekuly DNA k hydrolyzaci. Ztrátou dusíkaté báze vzniká ve struktuře DNA tzv. abazické místo. V případě depurinace je toto většinou v dalším kroku následováno zlomem v oslabeném abazickém místě. Vše probíhá v podmínkách se zvýšeným pH a DNA je takto degradována (*Friedberg C. Errol, DNA Repair and Mutagenesis, second edition, 2006*).

2.2 Replikační stres

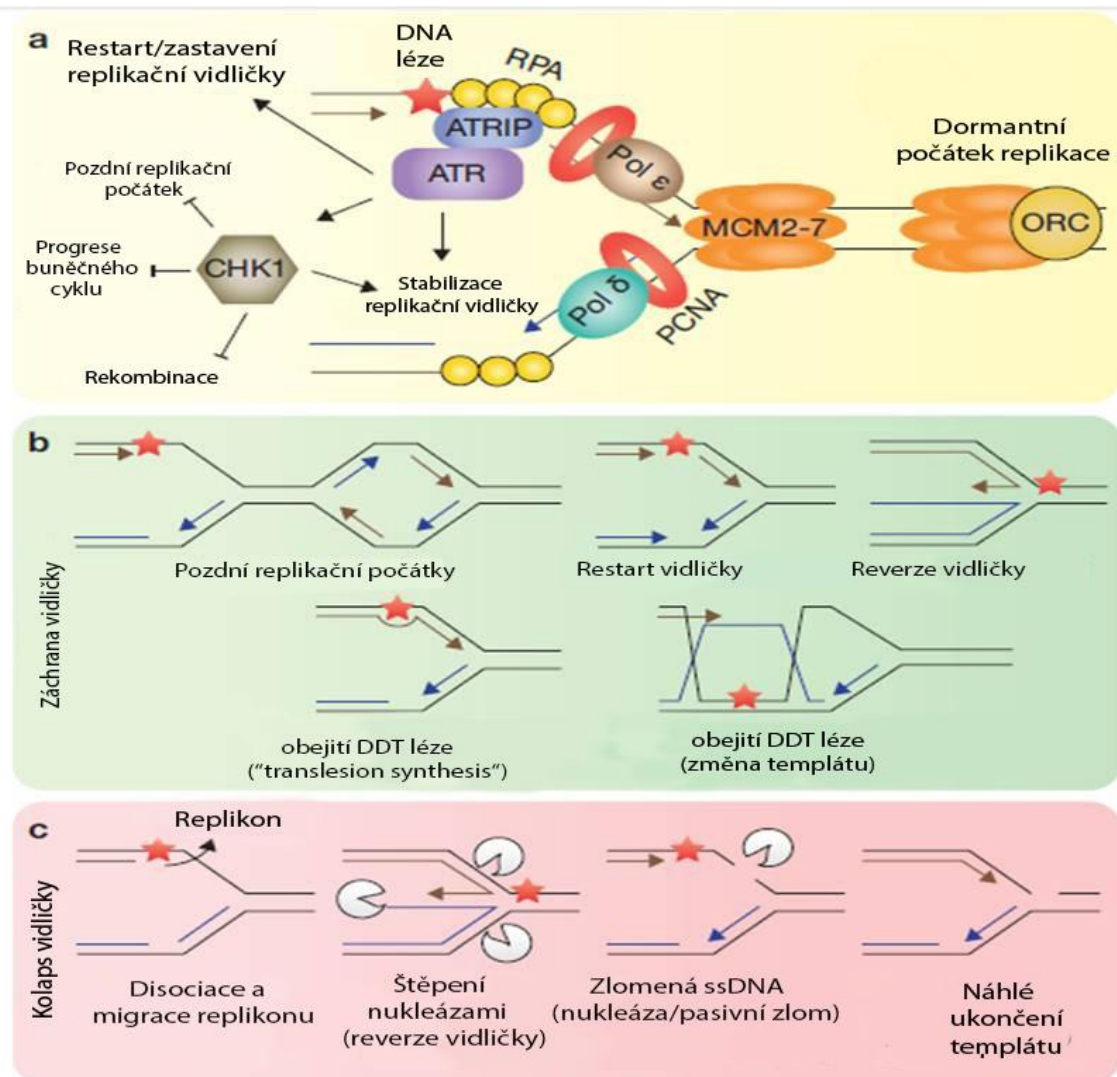
Jedná se o jev úzce spojený s tématem poškození DNA, kdy při replikaci DNA je replikační vidlička zpomalena oproti svému standardnímu postupu, či je úplně zastavena. Důvodem pro toto je celá řada překážek, mezi které se řadí inkorporace ribonukleotidů do DNA, hybridní molekuly RNA-DNA, nedostatek nukleotidů, repetitivní sekvence, transkripční komplexy, sekundární struktura DNA, fragilní místa, stres způsobený aktivními onkogeny a v neposlední řadě DNA léze. (*Zeman M., Cimprich K.A., 2014*).

Zastavení či zpomalení replikačního aparátu má za následek výskyt jednovláknové DNA (ssDNA) obalené replikačním proteinem A (RPA). Tento protein následně poskytuje signál pro zahájení procesu odpovědi buňky na replikační stres. Na místo se na základě tohoto signálu dostaví molekuly proteinů poskytujících možnost opravy či zvyšujících pravděpodobnost dokončení replikace i přes stresové podmínky. Tyto proteiny mají povětšinou kinázovou aktivitu a jeden z nejdůležitějších je ATR, dále je klíčová také ATM kináza. (*Zeman M., Cimprich K.A., 2014*).

ATR (ATM & Rad3-related) je zde centrální kinázou, která fosforyluje další molekuly za účelem zmírnění účinků replikačního stresu, kdy obecnou snahou těchto procesů je stabilizace replikačního aparátu. Klíčovými molekulami vyskytujícími se

v ATR dependentní dráze jsou Chk1 kináza a RPA. Účinek ATR je možno vystihnout ve dvou základních bodech, jimiž je konkrétně touto signální dráhou řešen problém replikačního stresu. Jedná se o pozastavení buněčného cyklu a zastavení aktivace pozdních replikačních počátků, což umožňuje získat čas pro případné odstranění zdroje stresu a akumulaci materiálu potřebného pro úspěšné dokončení replikace. Tímto dojde k přípravě pro restart replikační vidličky (Zeman M., Cimprich K.A., 2014).

V případě, že vlivy stojící za stresovým prostředím není možno odstranit, je zde možnost restartu procesu replikace i přes tyto podmínky. Specificky se jedná o stres způsobený DNA lézí, kdy je možno aberaci při replikaci obejít formou tzv. gapu za účasti DNA polymeráz η a κ náchylných k chybám při replikaci, kdy replikační aparát lézi vynechá. Tato možnost řešení předmětného problému se nazývá tolerance poškození DNA. Pokud toto možné není, a i přes aktivaci signální dráhy za účelem eliminace stresového faktoru či omezení jeho účinnosti nebyl tento proces úspěšný, dojde k selhání restartu replikačního aparátu a ke kolapsu replikační vidličky. Toto často znamená vznik dvojitého zlomu DNA a následnou aktivaci klasických cest opravy poškozené DNA, kterým se tato práce bude věnovat později (Zeman M., Cimprich K.A., 2014).



Obrázek 3: Mechanismus restartu a kolapsu replikačního aparátu. (a) Reakce na replikační stres iniciovaná ATR kinázou. Původní DNA je uvolněna a replikována pomocí polymeráz pro vedoucí a zpožďující se řetězec (Pol ϵ a Pol δ). Dále je navázán na PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Pokud je replikace zastavena, situace je rozeznána ATR kinázou a jejím partnerem ATRIP, čímž je iniciována signální dráha s efektorovou kinázou Chk1. Replikační vidlička je takto stabilizována a buněčný cyklus pozastaven. (b) Mechanismus restartu replikační vidličky. Po aktivaci signální dráhy ATR-Chk1 je replikační vidlička restartována aktivací dormantních replikačních počátků, znovuoobením replikace či reverzí replikačních vidličky pro aktivaci dráhy tolerance poškození DNA (DDT). (c) Mechanismus kolapsu replikační vidličky. Pokud je zastavená replikační vidlička dlouhodobě nestabilizována, dochází k jejímu kolapsu. Možným mechanismem kolapsu je disociace komponentů replikonu, štěpení nukleásami, reverze či zastavení replikační vidličky či náhlé ukončení templátu (Upraveno dle Zeman M., Cimprich K.A., 2014).

2.3 Genomická nestabilita

Genomická nestabilita je jedním z důsledků výskytu poškození DNA a s tím spojené mutagenese. Vzhledem k tomu, že každá buňka je podrobována neustálému tlaku vnějších faktorů a je také ovlivňována procesy probíhajícími uvnitř organismu, jedná se o velice častý jev. Nestabilita genomu je nežádoucí a znamená pro buňku a potažmo celý organismus nebezpečí a zátěž. Je tedy snahou organismu, aby jeho genetická informace obsahovala co možná nejméně chyb v zápisu a organismus byl nositelem co nejmenšího množství negativních mutací. V důsledku je snahou organismu také to, aby jeho genetická informace byla předána dceřinné generaci v co nejintaktnějším stavu (*Lord, J. Ashworth, A., 2012*).

2.3.1 Snaha o udržení genomické integrity

Pro udržení genomické stability a integrity byly vyvinuty opravné dráhy, jejichž aktivita cíleně odstraňuje DNA léze a mechanismy, které sice nejsou řazené k DDR, ale prokazatelně zabraňují zvyšování genomické nestability. (*Lord, J., Ashworth, A., 2012*).

Mezi tyto mechanismy patří například telomerické oblasti na koncích každého lidského chromozomu. Jedná se o repetitivní oblasti bohaté na guanin a cytosin, které interagují s množstvím proteinů a vytvářejí s nimi smyčky. K proteinům přítomným v telomerických oblastech se řadí proteiny vážící se na repetyce telomerické DNA TERF1 a TERF2 a faktory s nimi interagujícími TINF2, či proteiny chránící telomery POT1. Tyto struktury formují tzv. shelterin komplex a zabraňují chromozomům ve vzájemné fúzi, zajišťují jejich lineární strukturu a chrání je před narušováním nukleázami. Délka telomerických oblastí na koncích chromozomů je redukována při každém buněčném cyklu a je monitorována proteinem p53, který po dosažení kritické délky chromozomových telomer v konkrétní buňce vydá signál pro přechod buňky do senescence (*Artandi, S.E. a DePintho, R.A., 2010*)

Dalším mechanismem podporujícím genomickou integritu a spolupracujícím s DDR jsou proteiny schopné remodelovat strukturu chromatinu v buněčném jádře a tak zpřístupňovat léze molekulám schopným takto poškozenou DNA opravit. DDR dále spolupracuje s kontrolními body buněčného cyklu, které poskytují informace o stavu konkrétní buňky a poté mohou být zpětně signálními dráhami ovlivňovány. V neposlední řadě zde existuje také spojení se segregáčním aparátem. Toto vše

umožňuje podrobnou kontrolu genetického materiálu tak, aby byl předán dceřinné generaci buněk v co možná nejvíce intaktním stavu (*Warmedam, D.O., Kanaar, R., 2010*).

2.4 Dráhy odpovědi buněk na poškození DNA (DDR)

Vzhledem k potenciálně devastujícím efektům genomické nestability si buňky vyvinuly mnoho mezi sebou propojených mechanismů, jejichž úkolem je udržovat genomickou integritu. Obecně je tento soubor dějů označován termínem „dráhy odpovědi buněk na poškození DNA“ (DNA damage response). Vzhledem k široké škále poškození postihujících molekulu DNA a jejich vysoké variabilitě byly vyvinuty velice komplexní a specifické mechanismy opravy. Do procesů je řazena oprava nesprávného párování bází (MMR), bázová excizní oprava (BER), nukleotidová excizní oprava (NER), homologní rekombinace (HR) a spojování nehomologních konců (NHEJ). Je známo, že zde má důležitou roli také imunitní systém, který rozpoznává exogenní patogeny, ale také nestandardní buňky organismu vlastní (*Soria-Valles C., Lopéz-Soto A. et al, 2016*).

Základní mechanismus funkce těchto drah opravy poškozené DNA spočívá v rozpoznání daného poškození, dále jsou pomocí signálních molekul participujících na procesu opravy naakumulovány faktory nutné k jejímu provedení a v posledním kroku je překročeno k samotné opravě konkrétního poškození molekuly DNA (*Jackson, P., Bártek J., 2009*).

2.4.1 Oprava nesprávného párování bází a vystřížení nestandardní báze

Oprava nesprávného párování bází je mimo nápravy aberantního párování bází odpovědná také za opravu smyček vzniklých při delecí či inserci v procesu replikace. V této dráze jsou klíčovými komponentami senzory MSH2-MSH6 a MSH2-MSH3 pro rozpoznání léze, EXO1 s exonukleázovou aktivitou, polymeráza δ a ϵ pro dosyntetizování DNA a ligáza I pro opětovné spojení řetězce DNA. Klíčovými proteiny v tomto procesu jsou MSH2 a MLH1 kódované homologními geny mutS a mutL (*Lord, J., Ashworth, A., 2012*).

Vystřížení poškozené dusíkaté báze (BER) je často využívanou možností opravy. Tímto způsobem jsou napravovány škody způsobené oxidativními změnami, produkty

alkylace či jednovláknové zlomy, které jsou produkty opravy oxidativního poškození či nestandardní aktivitou topoisomerázy 1 a 2. Poškozená báze je zde často rozpoznána glykosylázou a dále se na opravě postupně podílí endonukleáza APE1 a AFE1 pro vystřížení aberantní báze, dále je chybějící úsek dosyntetizován polymerázou ϵ , δ či β a v poslední kroku proběhne opětovné spojení vlákna DNA pomocí ligázy I nebo III (Jackson, P., Bártek, J., 2009). Zde je při zařazování nových bází nutná kontrola jejich intaktnosti a případné zabránění použití jakýmkoli způsobem poškozené báze. Jedním z enzymů odpovídajících za kontrolu je NUDT5 (J. Lord a A. Ashworth, 2012). Klíčovou roli v tomto procesu hraje enzym poly(ADP-riboza) polymeráza 1 (PARP1) a poly(ADP-riboza)polymeráza 2 (PARP2) jako signální molekula, která přijímá informaci o poškození a dále jej předává (Jackson, P., Bártek J., 2009).

2.4.2 Vystřížení nesprávného nukleotidu

Další možností opravy aberantní DNA je vystřížení nukleotidu. V tomto procesu jsou zpracována některá rozsáhlejší poškození, mezi kterými lze jmenovat například rozsáhlé jednovláknové zlomy způsobené ultrafialovou složkou slunečního záření či větší adukty dusíkatých bází. Tento způsob opravy bývá rozdělen na dvě podskupiny. První z nich odstraňuje poškozené nukleotidy během transkripce, kdy je především prováděna v místech blokace probíhající transkripce a je detekována postupující polymerázou. Druhá podskupina pracuje na úrovni genomu a není aktivní pouze během procesu transkripce určité části DNA. V tomto případě je léze detekována z důvodu narušování párování bází a takto způsobené deformace dvoušroubovicové struktury DNA. V obou případech je v prvním kroku opravy DNA v okolí léze vystřížena ve formě oligonukleotidu skládajícího se z 22 – 30 nukleotidů, kdy jako klíčové endonukleázy zde působí ERCC1-XPF resp. XPG, a následně je odstraněný úsek DNA nahrazen nově nasyntetizovanou DNA v procesu replikace. (Jackson a Bártek, 2009, J. Lord a A. Ashworth, 2012).

2.4.3 Homologní rekombinace a spojování nehomologních konců

Nejkomplexnějšími procesy uplatňujícími se na opravě poškozené DNA je spojování nehomologních konců (non-homologous end joining, NHEJ) a homologní rekombinace (homologous recombination, HR). Oba tyto procesy jsou využívány především při opravě dvouvláknových zlomů DNA (Soria-Valles C., Lopéz-Soto A. et al, 2016).

2.4.3.1 Homologní rekombinace

Homologní rekombinace probíhá výhradně v S a G2 fázi buněčného cyklu. Jde o proces konzervativní opravy, kdy je DNA v okolí poškození nukleolyticky odstraněna a jako templát pro syntézu nové chybějící DNA je použita sekvence nukleotidů nacházejících se na sesterské chromatidě. Tento proces je vždy iniciován jednovláknovou DNA, kdy katalytickou molekulou je zde MRN komplex skládající se z restrikčního enzymu MRE1, proteinu opravy DNA RAD50 a NSB1 proteinu. V procesu homologní rekombinace jsou zapojeny především proteiny kódované geny BRCA1, BRCA2, RAD51 a PALB (*Moynahan, M. E. a Jasin, M., 2010*). Oprava DNA léze pomocí HR je vždy provedena ve směru 5' – 3' konec a výsledkem je zde jednovláknový přesah na 3' konci, který následně váže RPA a RAD51 (*Moureau, S., Luessing, J. et al., 2016*). Homologní rekombinace je procesem účastnícím se také opětovné aktivace zastaveného replikačního aparátu (*Jackson, P., Bártek J., 2009*).

2.4.3.2 Spojování nehomologních konců

Spojování nehomologních konců probíhá na rozdíl od homologní rekombinace v průběhu celého buněčného cyklu. Jedná se zde o jednoduché spojení dvou lepivých konců dvouvláknového zlomu místo dosyntetizování chybějících nukleotidů, což znamená nevyhnutelnou změnu v sekvenci DNA molekuly. Z tohoto důvodu je proces využíván v krizových situacích, kdy je nutná co nejrychlejší oprava poškozené molekuly DNA pro fungování organismu. Konkrétně při výskytu dvouvláknových zlomů vzniklých působením ionizujícího záření a chemikálií. Signální dráha v tomto případě i přes vysoký risk vzniku mutace zahájí proces opravy (*Lieber, M. J., 2010*). Dále má tento proces také speciální uplatnění při specifických procesech změny třídy imunoglobulinů a rekombinace V(D)J úseků variabilních oblastí imunoglobulinových řetězců (*Bassing, C.H., Alt, F.W., 2009*).

Dvouvláknové zlomy jsou v NHEJ rozpoznány Ku proteinem, který se následně váže na proteinkinázu DNA-PKcs, kterou tímto aktivuje a na místo léze jsou povolány enzymy zpracovávající konce nehomologních vláken DNA a enzymy opravy DNA XRCC4 a XLF/Cernunos. Vlákna DNA jsou nakonec spojena ligázou IV. Je známá také dráha opravy poškozené DNA založená na spojování nehomologních konců nezávislá na Ku proteinu, která se nazývá alternativní spojování konců neboli mikromologii zprostředkované spojování konců (MMEJ). Tento proces je vždy

spojen s delecí sekvence DNA (*Kuwano, Y., Nishida, K. et al., 2016, Jackson, P., Bártek J., 2009*).

2.5 Signální molekuly drah odpovědi buněk na poškození DNA

Dráhy popsány výše fungují na základě interakce mnohých signálních molekul, které jsou uspořádány do vzájemně propojených systémů a komplexně zajišťují co nejvýkonnější aparát pro opravu poškozené DNA (*Jackson, P., Bártek J., 2009*).

2.5.1 ATR, ATM, CHk1, CHk2 signalizace

ATM kináza je serin/threonin proteinkináza kódována stejnojmenným genem. Jedná se o protein o velikosti 350 kDa hrající nezastupitelnou roli v signalizaci poškození DNA, jehož aktivace je úzce spojena s komplexem MRN, kdy ATM přímo reaguje s jednou ze složek tohoto komplexu, NBS1. Celý název této kinázy zní *ataxia telangiectasia mutated* a je odvozen od názvu choroby, se kterou je ATM spojena. Dochází zde k mutaci v genu ATM, která je typickým znakem onemocnění Ataxia telangiectasia. Jedná se o vzácné neurodegenerativní onemocnění spojené se zvýšenou citlivostí postižených jedinců vůči ionizujícímu záření a tímto tvořenou predispozicí k rakovinným onemocněním (*Ahmed, M., Pinnix, C. H. et al, 2016, Guleria, A., Chandna, S., 2015*)

ATR kináza (ATM/Rad3 related) je také serin/threonin kináza kódovaná stejnojmenným genem aktivně se účastní cest odpovědi buněk na poškození DNA. Mimo aktivitu v podobě zprostředkování signálu o poškození DNA a povolání dalších faktorů účastnících se opravy je tato kináza specificky aktivní při replikačním stresu. ATR je povolána k místu zastavené replikační vidličky a fosforyluje další molekuly za účelem zmírnění účinků replikačního stresu, kdy obecnou snahou těchto procesů je stabilizace replikačního aparátu (*Manic, G., Obrist, F., 2016*).

Tyto kinázy jsou aktivovány výskytem dvojíých zlomů DNA v případě ATM, a jednovláknovou DNA s navázaným replikačním proteinem A (RPA) v případě ATR. Svou činností dále ATR cíleně aktivuje kinázu kontrolního bodu buněčného cyklu 1 (checkpoint kinase 1, CHK1), která je aktivní během všech částí buněčného cyklu a má

schopnost regulovat aktivaci dalších replikačních počátků, regulovat proces elongace, či kontrolovat stabilitu replikační vidličky. ATM aktivuje kinázu kontrolního bodu buněčného cyklu 2 (checkpoint kinase 2, CHK2). Tyto dále ovlivňují aktivitu cyklin dependentních kináz (CDK) například prostřednictvím p53 transkripčního faktoru. Procesy vedou ke zpomalení nebo zastavení buněčného cyklu v kontrolních bodech G1-S fáze, intra-S fáze či G2-M fáze. Výsledkem tohoto procesu je především prodloužení časové periody, která je k dispozici pro kontrolu intaktnosti DNA a opravu případného poškození. (*Shiloh, Y., 2003, Jackson, P., Bártek J., 2009, Guleria, A., Chandna, S., 2015*).

Dle studie korejského výzkumného týmu, která mimo jiné potvrdila možnost studia opravy DNA *in vivo* pomocí citlivé buněčné eseje a následného immunoblottingu, je možno shrnout kinetiku výše zmíněné signální dráhy následovně. Rychlejší je zde aktivace CHk1 kinázy a proteinu p53, což následuje po interakci s ATR kinázou reagující na výskyt jednovláknové DNA v oblastech se zastavenými replikačními vidličkami či mezerami po vystřížení nukleotidů v procesu opravy léze DNA. Po aktivaci osy ATR-CHk1 následuje v pozdější signalizaci aktivace osy ATM-CHk2 reagující na dvojité zlomy dvoušroubovice DNA (*Choi, J.H, Kim, S.Y. et al., 2015*).

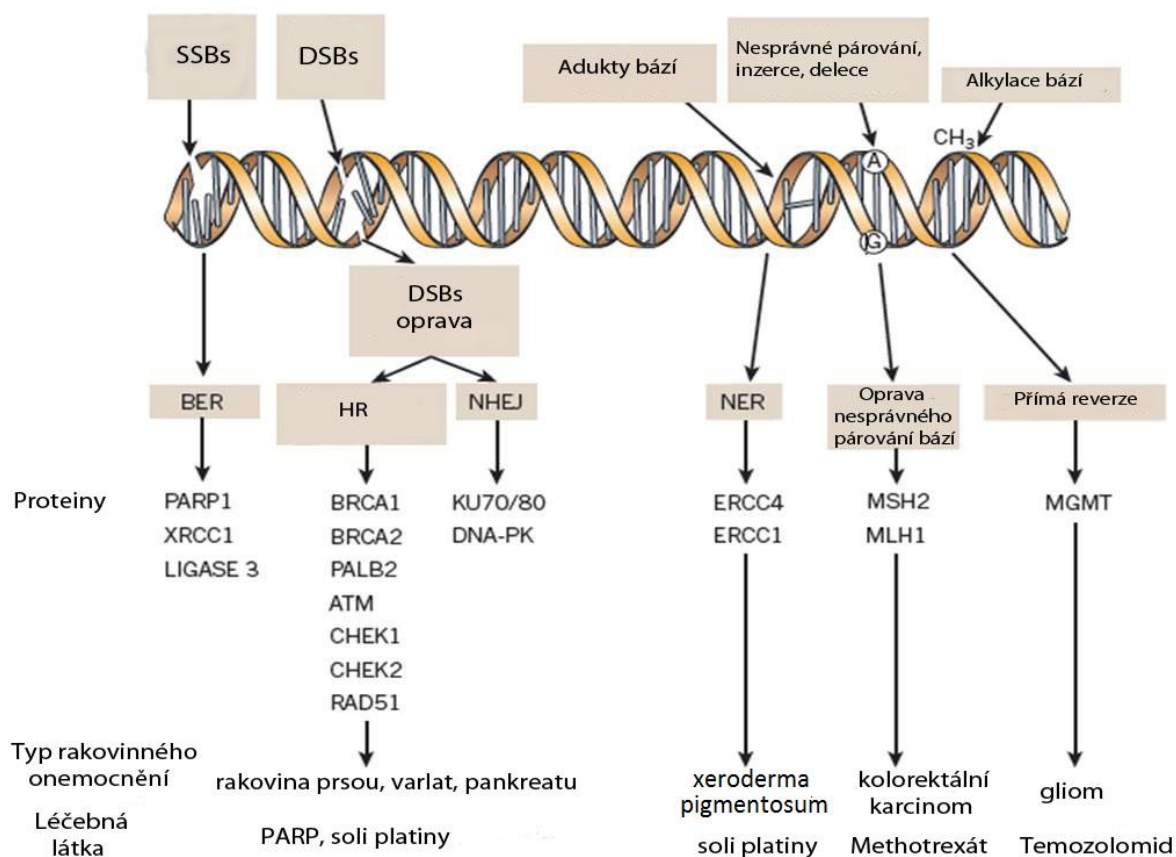
Paralelně se signální dráhou ATM/ATR – CHk2/CHk1 pracující v rámci kontrolních bodů buněčného cyklu se signalizace účastní také dráha TAO/p38/Mk2. Všechny tři molekuly participující v této signální dráze patří do rodiny MAPkináz a v této dráze dochází k jejich postupné aktivaci, přičemž konečnou signální molekulou je Mk2 kódovaná genem MAPKAPK2. Je aktivní při buněčné reakci na stres či zánět, při jaderném transportu, regulaci genové exprese a buněčné proliferace. K aktivaci této signální dráhy dochází, pokud je buňka zasažena ionizujícím zářením, ultrafialovou složkou slunečního záření či teplotním šokem (*Raman., M., Earnest, S. et al., 2007*).

Všechny výše popsané signální dráhy odpovědi buněk na poškození molekuly nesoucí genetickou informaci směřují k fosforylaci skupiny CDC25, což vede k úplnému utlumení aktivity fosfatáz CDC25 A, B a C a tímto dochází k zastavení buněčného cyklu (*Raman., M., Earnest, S. et al., 2007*).

2.5.2 Poly(ADP-ribóza)polymeráza 1 a 2

Děj uskutečňovaný oběma těmito enzymy se nazývá PARylace. Jedná se o navázání skupiny ADP-ribóza na cílový protein pomocí polymerizace, přičemž využívají NAD⁺ jako substrát a uvolňuje se nikotinamid. Výsledkem tohoto procesu je změna konformace, stability či aktivity takového cílového proteinu. PARP 1 se uplatňuje mimo jiné v opravě jednovláknových zlomů na molekule DNA, kdy má schopnost samostatně detekovat a vázat se na jednovláknové zlomy pomocí struktury zinkových prstů přítomných na molekule PARP 1 proteinu. Následně dochází k zpětné PARylaci samotného PARP 1 a dalších pomocných proteinů jako je XRCC1 či histony H1 a H2B ve snaze opravit konkrétní lézi (*Rouleau, M., Patel, A. et al., 2010*).

V případě, že tyto výše popsané kroky jsou neúspěšné a dojde k vytvoření dvouvláknového zlomu molekuly DNA, je aktivován H2AX a následně jsou exprimovány BRCA1 a BRCA2, jejichž produkty se účastní opravy dvouvláknových zlomů DNA (*Min Kim, K., Jae Moon, Y. et al., 2016*).



Obrázek 4: Systém odpovědi buněk na poškození DNA (DDR) v souvislosti s rakovinným onemocněním. Volba způsobu opravy je závislá na typu léze a fázi buněčného cyklu, ve které se daná buňka nachází. Obrázek ukazuje klíčové proteiny aktivní v každé ze zobrazených drah DDR, dále typy rakovinných onemocnění spojovaných s konkrétní DDR cestou a látku využívanou v léčbě onemocnění. (Upraveno dle Hoeijmakers, J.H., 2001).

2.5.3 Apoptóza a senescence

Pokud je poškození molekuly DNA rozsáhle do té míry, že její úspěšná oprava je signálními molekulami vyhodnocena jako neuskutečnitelná, jsou tyto buňky poslány do senescence či apoptózy (Jackson, P., Bártek J., 2009).

Apoptóza, jinak také nazývána programovaná buněčná smrt, je proces, kdy buňka, která je defektní v některém klíčovém aspektu své existence, aktivuje procesy vedoucí k jejímu zániku způsobem, který nepoškozuje buňky okolní. Proces může být aktivován dvěma způsoby. První z nich je tvořen signály přicházejícími z jiné buňky, kdy je apoptóza takto šířena v konkrétní tkáni, nebo mají signály vedoucí k buněčné

sebevraždě původ uvnitř buňky, která apoptózu následně iniciuje. Klíčovými molekulami jsou zde kaspázy. Jedná se o enzymy s funkcí proteáz, jež po aktivaci již není možné deaktivovat a tudíž buňka, ve které byl iniciován proces apoptózy, není schopná tento děj zvrátit. Mezi charakteristiky apoptické buňky patří změna tvaru, fragmentace jádra a kondenzace chromatinu (*Mercer, J., Mahmoudi, M et al., 2007*).

Senescence je proces stárnutí buňky. Je iniciován po konkrétním množství dokončených buněčných dělení. Buňka se po zahájení procesu senescence již není schopná dělit a následně zaniká. Signálem k zahájení je dosažení kritické délky telomerických oblastí chromozomů, jejich následná fúze a také akumulace poškození DNA (*Aravintan, A., 2015*).

2.5.4 Aktivace imunitního systému a zánětlivé procesy

Činností DDR je kromě procesů popsaných výše uveden v činnost imunitní systém a tím také zánětlivé procesy organismu. Jedná se o systémovou reakci, která doprovází odpověď buněk na poškození. Imunitní systém zde reaguje na nestandardní tkáň pomocí klasických nástrojů, které představují molekuly specificky rozpoznávající konkrétní motiv na buňce a následně dochází k předání signálu kompetentním buňkám, které jsou vybaveny k tomu, aby se s takovou situací vyrovnaly. Je zde aktivní jak vrozená, tak adaptivní imunita, přičemž vrozená je stěžejní (*Bartková, J., Takáčová, S., et al., 2012, Soria-Valles, C., Lopéz-Soto, A. et al., 2016.*).

Poškozené či mrtvé buňky a buňky v senescenci jsou rozpoznány imunitním systémem pomocí konkrétních motivů obecně označovaných jako DAMPs (Danger associated molecular patterns) a PRRs (Pattern recognition receptors), jejichž aktivita v podobě signálů vede mimo jiné k uvolnění cytokinů startujících zánětlivý proces v organismu. Z obranných systémů organismu dostupných v rámci nespecifické imunity je zde zejména aktivní výčet buněk nacházejících se v krvi, jako jsou dendritické buňky, neutrofily, makrofágy, které patří k tzv. APC (Antigen presenting cells) a mají schopnost prezentovat na svém povrchu antigeny asociované s poškozením DNA CD58 a CD59, a především NK-buňky (*Candeias. S.M., Testard, I., 2015, Pateras, I.S. et al., 2015*).

NK-buňky rozpoznávají defektní buňky dle souboru receptorů na povrchu cílových buněk a využívají signálů exprimovaných těmito receptory. Příkladem systému, kterým NK-buňky rozlišují zdravé od zasažených buněk je systém molekul hlavního histokompatibilního komplexu 1 (MHC1), které jsou přítomny na všech zdravých buňkách organismu a jsou vysoce specifické. Tyto MHC molekuly jsou kompromitovány na povrchu buněk poškozených například virovou infekcí či maligní transformací (*Marino, G., Ugalde, A.P. et al., 2010*).

Další možností, jak mohou komponenty nespecifické imunity identifikovat poškozenou buňku, je analýza exprese aktivačních receptorů, mezi které patří především DNAM-1, NCRs a NKG2D. Tyto ligandy reagují na určitý stres, kterým je buňka zasažena po infekci virem či maligní transformací a jejich exprese je v tomto případě zvýšena (*Lopéz-Soto, A. et al, 2015*).

Imunitní systém je tedy velice důležitý pro své působení proti maligním transformacím buněk. Toto je pozorováno například u imunodeficientních pacientů či pacientů po transplantaci, kterým jsou podávána imunosupresiva. U těchto pacientů je zvýšená možnost vývoje rakovinného onemocnění. Aktivace imunitního systému při výskytu maligně transformované tkáně má za následek některé zásadní systémové odpovědi organismu na tuto situaci, jako je například aktivace ubiquitin-proteazomového systému, či SASP (senescence-associated secretory phenotype) zodpovědného za nasměrování rakovinných buněk do senescence (*Iannello, A., Thomson, T.W., 2013*).

V případě chronické DDR, která následně spustila zánětlivé procesy, tedy aktivovala imunitní systém, mohou být účinky takových procesů také negativní. Jedná se především o narušení homeostázy tkání a celkového fungování kmenových buněk. Výše zmíněný SASP aktivuje NK-buňky pomocí signálních chemokinů. Ovšem pokud stav přetrvává, je SASP schopen také iniciovat expresi zánětlivých cytokinů jako jsou IL-6 a IL-8, které regulují růst nádoru a jsou schopny podporovat rakovinné onemocnění pomocí růstových a podpůrných faktorů (*Soria-Valles, C., Lopéz-Soto, A. et al., Chatzinikolaou, G., Karakasilioti, I., 2014*). v lese

2.6 Rakovinná onemocnění, poškození DNA a DDR

Přestože dodnes nejsou známy přesné informace o dějích odehrávajících se v nádorových tkáních, podařilo se prokazatelně spojit některé typy rakovinných onemocnění s konkrétním poškozením DNA nádorových buněk. Tyto změny na molekule DNA lze pozorovat například v oblastech opakování dinukleotidových sekvencí v podobě defektních oprav nesprávného párování bází, což je také nazýváno nestabilita mikrosatelitů a tvoří predispozice pro karcinom endometria a kolorektální karcinom. Dále se objevují chyby v procesu homologní rekombinace. Ta je zasahována mutací či epigenetickým umlčováním konkrétních genů, které se takto stávají nefunkční. Geny, které jsou tímto prokazatelně zasahovány, jsou geny BRCA1 a BRCA2, PALB2, ATM a varianty genu RAD51. Mutace na těchto genech je spojována s vývojem dědičných rakovin prsou, varlat, prostaty a pankreatu (*Jackson, P., Bártek J., 2009*).

V souvislosti s vysokou frekvencí poškození DNA, které je, jak se zdá, cílené, je běžnou vlastností rakovinných buněk genomická nestabilita. Je pravděpodobné, že se jedná o spojení efektů poškození DNA, pro tumorigenezi specifických defektních oprav poškozené DNA a neschopnosti zpomalit či zastavit buněčný cyklus před tím, než je poškozená DNA předána dceřinné generaci. Jako příklad tohoto lze uvést genomickou nestabilitu tumorů lymfoidní tkáně, kdy jsou ve velké většině případů identifikovány chromosomální translokace způsobující spojení onkogenních lokusů s lokusy antigenních receptorů. Tohoto je pravděpodobně dosahováno abnormální rekombinací genu pro antigen a receptor. Většina karcinogenů tedy pracuje na bázi vytváření poškození DNA a následné mutagenese. Je tedy snahou organismu těmto mutacím předcházet, mutace odstraňovat a v neposlední řadě zabránit předání škodlivých mutací dceřinné generaci buněk (*Lord, J. a Ashworth, A., 2012*).

2.6.1 Protein p53

Protein p53 je znám jako tzv. „gate keeper“, který rozpoznává jakékoli buněčné transformace naznačující rozvíjející se malignitu. Jedná o supresor nádorového bujení s mnoha funkcemi, mezi nimiž jedna z nejdůležitějších je schopnost ovlivňovat buněčný cyklus v závislosti na přítomnosti a míře poškození molekuly DNA konkrétní buňky. Protein p53 je svou činností jako transkripční faktor schopen aktivovat další molekuly

účastníci se opravy DNA léze a zároveň upravovat délku jednotlivých fází buněčného cyklu, poskytují tak čas na opravy, které napomáhal iniciovat. Zároveň je schopen iniciovat ukončení buněčného cyklu defektní buňky a aktivovat apoptózu či senescenci (Moureau, S., Luessing, J. et al., 2016, Haurte., M., 2016). Při své činnosti spolupracuje také s RNA. Konkrétně se jedná o nekódující RNA s délkou až 200 nt, které se podílejí na kvalitě a přesnosti odpovědi předmětného proteinu (Haurte., M., 2016). Protein p53 je dle výzkumu provedeného Moureau a jejím týmem molekula, která mimo jiné zajišťuje rovnováhu mezi HR a NHEJ, kdy pozitivně reguluje 53BP1 (p53 binding protein 1), který iniciuje opravu dvojitých zlomů přes NHEJ, a následně 53BP1 negativně reguluje BRCA1, což je jeden z důležitých proteinů opravy DSBs pomocí HR. Regulace míry, jakou se homologní rekombinace podílí na opravě DSBs je výhodná i z toho důvodu, že nevhodně iniciovaná HR může vést i k rozsáhlé přestavbě genomu v případě, že se v buňce nenachází intaktní sada homologních vláken DNA sloužících jako templát (Moureau, S., Luessing, J. et al., 2016, Haurte., M., 2016).

2.6.2 Další onemocnění spojená s mutacemi genů DDR a akumulací DNA lézí

Další mnohá onemocnění byla spojena s mutacemi genů vyřazujících je z funkce. Mezi tato onemocnění patří Bloomův syndrom, Warnerův syndrom či Faconihovo anemie, syndrom křehkého X chromozómu, diabetes mellitus 2, myotonická dystrofie, Creutzfeldt-Jakobova nemoc, ataxia tlangiectasia, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba či Huntingtonova choroba. Za vznikem těchto chorob stojí většinou jako jedna z příčin citlivost k ionizujícímu záření, s tím spojeným vyšším výskytem poškození DNA v podobě dvouvláknových zlomů a sníženou schopností tato poškození cíleně opravovat. Dále ke vzniku přispívá například změna počtu opakování repetitivních sekvencí v lokusu charakteristickém pro danou chorobu, které se tak stávají nestabilními (Moynahan, M.E., Jasin, M., 2010).

Poškození DNA má důležitou roli ve vývoji neurodegenerativních onemocnění, z nichž některá byla zmíněna ve výčtu výše. Je to dáno akumulací lézí na molekule DNA neuronu, který je typický tím, že v diferencovaném stádiu se dále dělí jen velmi málo a je jen omezeně nahrazován. Další skutečností přispívajícím ke zvýšené citlivosti je fakt, že plně diferencované neurony jsou v G0 fázi buněčného cyklu, tedy není možno opravovat případné poškození DNA pomocí homologní rekombinace. V neposlední

radě je nervová tkáň metabolicky velice aktivní a mitochondriální metabolismus je provázen vznikem volných kyslíkových radikálů. Genetická informace nervové tkáně tak ztrácí stabilitu a je zde zvýšená pravděpodobnost vývoje chorob (*Ross, U., Ahel, I. et al., 2007*).

Pro defektní buňky, jejichž poškození je rozsáhlé a bylo systémem signálních drah vyhodnoceno jako neopravitelné, je povětšinou indukována apoptóza. Jeden ze základních proteinů, indukujících u buněk apoptózu, je protein p53. Tento protein má ovšem také roli ve vývoji aterosklerózy. Toto onemocnění je doprovázeno zvýšenou mírou poškození DNA a tím zvýšenou signalizací DDR. Toto vede k apoptóze či senescenci buněk hladké svaloviny cévních epitelů za účelem eliminace poškození. Tak může přispět DDR k rozvoji onemocnění kardiovaskulárního systému a má negativní dopady například při srdečním infarktu či cévní mozkové příhodě (*Mercer, J., Mahmoudi, M et al., 2007*).

2.7 Možnost využití inhibice DDR v léčbě rakoviny

Pacienti s rakovinným onemocněním jsou podrobováni léčbě zahrnující povětšinou chirurgické odstranění zasažené tkáně, kdy poté následuje cílená eliminace možné zbytkové nádorové tkáně v okolí původního tumoru. V této druhé části léčby je využíváno ionizující záření či specifické chemické látky, kdy principem účinnosti obou těchto variant následné léčby je vznik DNA lézí. Příkladem takového chemoterapeutika jsou například soli platiny, které způsobují křížové vazby. Toto poškození je následně rozpoznáno a cíleně opraveno kombinací opravy vystřížením nukleotidu a homologní rekombinace. Z tohoto faktu vyplývá, že klíčovým aspektem terapie je její co největší specifita a přesnost, přičemž existuje neustálá snaha dosahovat vyšší míry obou. Právě princip fungování terapie je při její indikaci limitující s ohledem na použité dávky, neboť je zde brán zřetel na zdravé tkáně, které jsou i přes veškerou snahu do určité míry vždy zasahovány (*Lord J. a Ashworth, A., 2012*).

Důležitým aspektem zde je skutečnost, že dráhy DDR jsou stále aktivní i v nádorové tkáni a tak v podstatě pracují proti účinkům terapie. Tento princip se uplatňuje také při vzniku rezistence daného pacienta na některé druhy terapie. Zde má tedy základ myšlenka týkající se inhibice drah odpovědi buněk na poškození DNA,

kteřá je podpořena také faktem, že změny v nádorové tkáni mají velice často za následek deaktivaci některé z drah DDR využívaných buňkou (*Jackson, P., Bártek J., 2009*). Transformované buňky tedy v tomto případě pozbývají funkce některé z důležitých drah DDR oproti buňkám nenádorovým, a tedy při inhibici konkrétní vybrané dráhy DDR jsou nenádorové buňky zvýhodněny při snaze opravit poškození DNA, které případně postihlo jejich genetickou informaci v reakci na přítomnost agens podávaného do těla pacienta při terapii (*J. a Ashworth, A., 2012*).

Z výše zmíněného vyplývá, že cílenou inhibicí dráhy DDR by se měla zvýšit účinnost samotné terapie ionizujícím zářením či chemoterapeutikem, neboť bude omezena možnost zpětné opravy poškození DNA, které utrpěly buňky cílové tkáně. Tato hypotéza byla potvrzena a uvedena v praxi v podobě první generace inhibitorů cílících konkrétní molekulu participující v procesech opravy poškozené DNA, kdy se jednalo o enzymy Topoisomeráza I a Topoisomeráza II se schopností způsobit zlom na fosfodiesterové kostře molekuly DNA a takto vzniklé volné konce následně spojí do výhodnějšího uspořádání terciární struktury DNA, což předchází procesům transkripce či replikace. Aktivita těchto enzymů je inhibována látkami irinotecan a etoposid, které znemožňují opravu zlomů DNA a byly využity v léčbě kolorektálního karcinomu v případě irinotecanu inhibujícího Topoisomerázu I, či v léčbě Ewingova sarkomu, rakoviny varlat a plic, či lymfomů a lymfocytické leukemie v případě etoposidu inhibujícího Topoisomerázu II (*Pommier, Y., Leo, E. et al., 2010*).

Dalšími inhibitory využívanými v léčbě konkrétních typů rakovinných onemocnění jsou inhibitory enzymů skupiny PARP. Jedná se o inhibitory DDR druhé a třetí generace, jejichž vývoj byl podmíněn postřehem vědců, že produkt katalytické aktivity PARP, nikotinamid, je jeho mírným inhibitorem. První funkcí PARP inhibitorů byla jejich schopnost zvýšit citlivost pacienta k chemoterapii. Například 3-aminobenzamid prohlubuje cytotoxický účinek dimethyl sulfátu, který methyluje DNA, či další, klinicky využívané PARP inhibitory zvyšují účinnost jiného agens methylujícího cílovou DNA, temozolomidu (*J. a Ashworth, A., 2012, Rouleau, M., Leo, E. et al., 2010, Jackson, P., Bártek J., 2009*)).

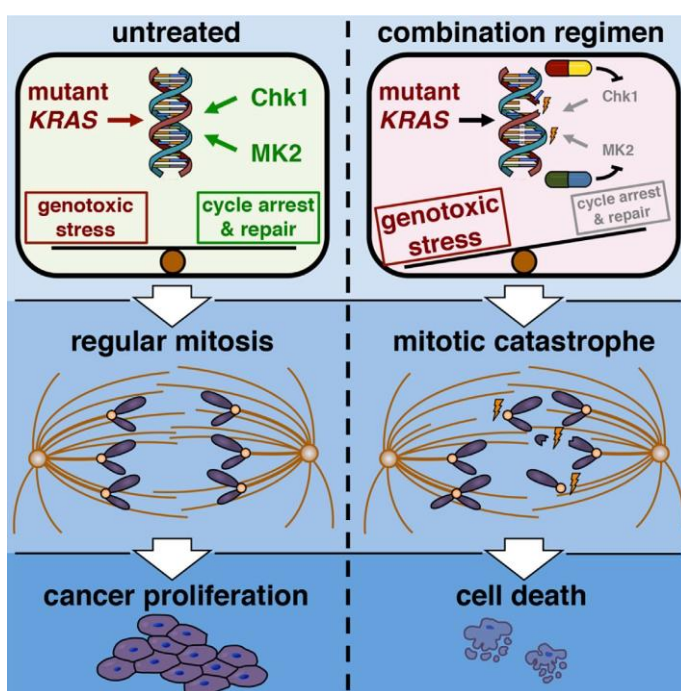
Nejprůlomovější využití PARP inhibitorů ovšem nabídl objev, že inhibice této dráhy odpovědi buněk na poškození DNA dobře koreluje s inhibicí růstu buněk defektních v genech BRCA1 či BRCA2 (*Jackson, P., Bártek J., 2009, Farmer, H. et al.,*

2005). Produkty těchto genů se velkou měrou podílejí na opravě poškození pomocí procesu homologní rekombinace, což znamená, že pokud je mutován právě některý z těchto genů, homologní rekombinace nemůže fungovat správně. Jednou z možností činnosti těchto inhibitorů je pravděpodobně znemožnění uvolnění PARP navázaného na jednovláknovém zlomu, nebo další možností je úplná inhibice tohoto enzymu, dovolující přetrvávající přítomnost jednovláknových zlomů na mnoha místech genomu. Obě tyto potenciální situace vedou k vytvoření dvojitého zlomu na DNA, který je možnou příčinou smrti buňky. Ve zdravých buňkách by tato situace byla postoupena homologní rekombinaci, která je kompetentní ji vyřešit, ovšem pokud je i ta narušena například mutací genu BRCA1 či BRCA2, dvojitý zlom nelze již opravit a buňka je odsouzena k zániku. Tento koncept je konkrétně využíván v léčbě rakoviny prsou, varlat a prostaty, kde je velice častý výskyt mutace v genech BRCA1 či BRCA2 a tito pacienti poté dobře reagují na léčbu (*J. a Ashworth, A., 2012, Jackson, P., Bártek J., 2009*).

Tato specifická závislost účinnosti PARP inhibitoru na genotypu byla prvním impulzem ke vzniku konceptu tzv. syntetické letality vytvořeného Dobzhanským, Lucchesim a dalšími, který říká, že jednotlivé defekty zasahující genetickou informaci mohou být slučitelné s další existencí buňky, ovšem pokud se zkombinují konkrétní defekty zasahující konkrétní geny, výsledkem může být buněčná smrt. Výzkumy jsou zaměřeny také na to, aby se podařilo identifikovat další molekuly jako determinanty hrající roli v míře citlivosti buňky na inhibici PARP, přičemž většina takovýchto molekul svou činností ovlivňuje proces homologní rekombinace. Patří zde například ATM, ATR, CHk1, CHk2, RAD51 a další. Po objevu interakce BRCA/PARP se další ze zkoumaných interakcí stává například kombinace nesprávně fungující cesty opravy špatného párování bází a mutace v genech kontrolujících odpověď na oxidativní poškození, mezi kterými je možno jmenovat POLB, POLG a PINK1 (*J. a Ashworth, A., 2012, Johnson, N. et al., 2011*).

Dalšími cílovými molekulami pro inhibici jsou kinázy účastnící se DDR (*Benada, J, Macurek, L., 2015*). CHk1 kináza působí v jedné z nejdůležitějších známých signálních drah účastnících se opravy poškozené DNA, kdy spolupracuje s klíčovou ATR kinázou. V této signální dráze jsou rozpoznány jednovláknové DNA, které jsou následkem SSB, a také zastavené replikační vidličky. Inhibice CHk1 za podmínek replikačního stresu může způsobovat kolaps replikační vidličky (viz obrázek

3). Konečnou cílovou molekulou této signální dráhy je molekula CDC25B, kdy její fosforylaci dochází k zastavení buněčného cyklu. Tudíž inhibicí této signální dráhy dochází k selhání zastavení buněčného cyklu a přítomné poškození DNA nemůže být opraveno ještě před jeho dokončením. Molekula CDC25B je zároveň cílovou molekulou dráhy TAO/p38/Mk2. Při utlumení fosforylace CDC25B je tak nutné zvážit inhibici obou drah, které konvergují na CDC25B, tedy jednak ATR/Chk1, a také TAO/p38/Mk2. Při experimentech se ukázalo, že u určité skupiny buněčných linií má použití obou inhibitorů o mnoho znatelnější účinky na viabilitu v porovnání s jednotlivými inhibitory. Kombinace Chk1i a Mk2i v podmínkách replikačního stresu se tedy stala pro vědce velice zajímavou (Dietlein *et al.*, 2015).



Obrázek 5: *Chk1 a Mk2 jsou v drahách opravy poškozené DNA naprosto nezastupitelné molekuly nejen u buněk nádorových. Funkční dráhy jsou schopny umožnit opravu poškozené DNA a eliminovat dopady nepříznivých faktorů působících na genetickou informaci buněk, kdy je v možnostech těchto drah zastavit či zpomalit buněčný cyklus a iniciovat opravu. V případě jejich inhibice dochází k nadměrné akumulaci nepříznivých vlivů, které svými účinky zasahují DNA – tzv. genotoxický stres. Následkem takového procesu je selhání buněčného dělení a následná buněčná smrt (převzato od Dietlein *et al.*, 2015.).*

Terapie strategicky cílí na klíčové komponenty signálních drah odpovědi buněk na poškození DNA je tedy jednou z možností pokroku léčebných terapií využívaných při boji s rakovinným onemocněním v duchu v poslední době prosazovaného konceptu personalizované medicíny (Jackson, P., Bártek J., 2009).

3 Cíl práce

Cíl práce spočíval v testování účinků inhibice kináz, které se účastní klíčových drah odpovědi buněk na replikační stres. Konkrétně se jednalo o ChK1, Mki2 kdy po inhibici těchto kináz pomocí konkrétních inhibitorů či jejich kombinací, byl sledován vliv takového stavu na viabilitu nádorové buněčné linie v porovnání s účinky na linii nenádorovou. Jedním z důležitých aspektů zde bylo testování synergických účinků kombinace inhibitorů ChK1i a Mki2i na leukemické linie, která dle závěrů výzkumu Dietleina a kolektivu z roku 2015 vykazuje vyšší účinnost než samotný inhibitor Chk1i jistých buněčných linií buněčných linií (*Dietleine et al, 2015*). Z výsledků bylo poté možno vyvodit závěry o možnostech využití této strategie v léčbě rakovinných onemocnění.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Pomůcky a vybavení

Pro experimentální část bakalářské práce byly využity tyto přístroje a vybavení: flowbox s horizontálním prouděním vzduchu Thermo Fisher Herasafe, CO₂ inkubátor Heracell, automatický počítáč buněk a analyzátor viability buněk BECKMAN COULTER Vi-Cell XR, světelný mikroskop Zeiss, fluorescenční mikroskop ScanR s automatizovaným snímáním, průtokový cytometr Becton Dickinson FACS Verse, centrifuga Combi 514R, ELISA reader – Infinite M200 Pro reader (Tecan), automatické pipety Eppendorf, skleněné pipety, plastové zkušavky (50 ml, 15 ml), mikrozkušavky Eppendorf (1,5 ml), 96-ti jamkové desky, 6-ti jamkové desky, třepačka (EASTPORT LIFESCIENCE), kultivační plast TPP.

4.1.2 Chemikálie a roztoky

Při provádění experimentů byly v rámci praktické části této práce použity následující chemikálie a roztoky: RPMI médium (Gibco by life technologies), interleukin 6 (IL-6) (Prospect), interleukin 3 (IL-3) (Prospect), stem cell factor (SCF) (Prospect), Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (Prospect), dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma), fetální bovinní sérum (FBS) (Invitrogen), penicilin, streptomycin (Sigma), MEM NEAA (Gibco by life technologies), PBS pufr, Trypsin (Sigma), check point kinase 1 inhibitor PF-477736 (Chk1i) (Sigma), , mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 inhibitor (Mk2i) (Sigma), tamoxifen (4oht) (Sigma), formaldehyd (Sigma), PBS pufr, Triton X-100 (Sigma), Tween-20 (Sigma), primární protilátka rabbit – 2577 (Cell Signalling), sekundární protilátka Alexa flicr 488, goat anti-rabbit IgG, A11034 (Invitrogen), hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma), Propidium jodid (Sigma).

4.1.3 Buněčné linie

4.1.3.1 MII-ENL-ERtm myší buněčná linie

Tato buněčná linie pochází z myšího modelu, kde exprese onkogenu MII-ENL a funkce jeho proteinového produktu je striktně závislá na přítomnosti tamoxifenu nebo 4-hydroxytamoxifenu. Tohoto je docíleno fúzí s vazebnou doménou mutovaného estrogenového receptoru. Fúzní gen MII-ENL-ERtm je součástí alely přítomné v embryonálních kmenových buňkách. Takto byla vytvořena generace jedinců, u nichž bylo možno po dlouhodobém podávání tamoxifenu konstatovat rozvoj myeloproliferativní choroby. Za stálého podávání tamoxifenu onemocnění u poloviny zvířat progrezovalo do myeloidní leukemie s dobou dožití 592 ± 112 dní (Takáčová, S., Slaný, S., Bártková, J., Stránecký, V., Doležel, P., Lužná, P., Bártek, J., Divoký, V., 2012).

Při experimentech prováděných v rámci této práce byly použita buněčná kultura získaná z leukemických buněk sleziny výše popsaného myšího modelu v terminální fázi myeloidní leukemie. Jedná se o model leukemické linie poměrně názorný, u kterého je funkce MII-ENL závislá na přítomnosti tamoxifenu/4-hydroxytamoxifenu. Kultivace v médiu bez 4-oh_t umožňuje utlumit expresi onkogenu a vede k zastavení proliferace buněk.

4.1.3.2 Buněčné linie CEM a K562

Jedná se o buněčné linie odvozené z lidských leukemických buněk. CEM je odvozena z T lymfoblastů periferní krve čtyřleté dívky trpící akutní lymfoblastickou leukémií. K562 je odvozena z lymfoblastů kostní dřeně 53leté ženy trpící chronickou myeloidní leukémií (ATCC).

4.1.3.2 Kontrolní buněčné linie

Linie MRC-5 je buněčná linie odvozená z fibroblastů izolovaných z plicní tkáně 14 týdnů starého plodu. BJ je buněčná linie odvozená z kožních fibroblastů novorozeněte (ATCC).

4.2 Metody

4.2.1 Rozmraz a kultivace suspenzních a adherentních buněčných linií

- Suspenzní buněčná kultura byla vytvořena z buněk udržovaných v tekutém dusíku (-180 °C), které bylo nutné po vyjmutí v co nejkratší době rozmrazit.
- K 1 ml buněčné suspenze bylo přidáno 10 ml RPMI media, čímž byl zředěn obsah DMSO na koncentraci 0,1 %.
- Buňky byly centrifugovány při 200 g po dobu 5 minut.
- Médium bylo ze zkumavky odsáto tak, aby pelet na dně zůstal nedotčen.
- Buňky byly resuspendovány ve 2,5 ml RPMI média, které bylo v případě MII-ENL-ERtm buněčné kultury obohaceno o růstové faktory (viz kapitola 4.2.1.1). V případě lukemických buněčných linií bylo toto médium obohaceno o FBS (10 %) a antibiotika.
- Buněčná kultura byla napipetována do jedné z 6 jamek kultivační desky.
- Buněčná kultura byla uchovávána v inkubátoru při teplotě 37°C.
- Po 2-3 dnech byla z původní vytvořena buněčná kultura nová za doplnění čerstvého kultivačního média v poměru 1: 2.
- V tomto bodě byla buněčná kultura MEERtm rozdělena do dvou jamek na kultivační desce.
- Jedna z nich byla přenesena do plastové zkumavky a centrifugována při 200 g po dobu 5 minut. Dále byla resuspendována v kultivačním médium bez 4-hydroxytamoxifenu a přenesena do kultivační jamky. Takto byla buněčná kultura udržována přibližně 4 – 5 dní pro co největší omezení exprese fúzního genu MII-ENL-ERtm.
- Buněčná kultura adherentní byla po rozmrazení upravena stejným způsobem, jako buněčná kultura suspenzní s tím rozdílem, že zde bylo použito DMEM médium, které je vhodné pro kultivaci adherentních buněčných linií. Toto médium bylo obohaceno o FBS (10%), antibiotika a NEAA (neesenční aminokyseliny).
- Během kultivace byla buněčná kultura vždy po dosažení 90% konfluence pasážována.
- Vývěvou bylo odstraněno médium z kultivační láhve.

- Buňky byly opláchnuty 5 ml PBS pufrem.
- K buňkám byly napipetovány 2 ml Trypsinu. Následovala inkubace po dobu 5 minut ve 37°C. K buňkám bylo napipetováno 8 ml kultivačního média.

4.2.1.1. Příprava média

Tabulka 1: Příprava kultivačního média pro kultivaci MEERtm buněk

Složka	C pracovního roztoku	Objem	C konečná
RPMI	-	44,5 ml	-
FBS	--	5 ml	10 %
IL-3	100 µg/ml	5 µl	10 ng/ml
IL6	100 µg/ml	5 µl	10 ng/ml
GM-CSF	100 µg/ml	5 µl	10 ng/ml
SCF	500 µg/ml	10 µl	100 ng/ml
penicilin, streptomycin	10000 U/10 mg/ml	500 µl	1000 U/100 µg/ml
celkem	-	50 ml	-

- Do RPMI média byly napipetovány ostatní složky dle tabulky (viz tabulka 1).
- Z plastové zkumavky bylo odpipetováno 25 ml.
- Do jedné ze zkumavek bylo napipetováno 25 µl 4-hydroxytamoxifenu tak, že jeho původní koncentrace 10 mM byla zředěna na koncentraci 100 nM.

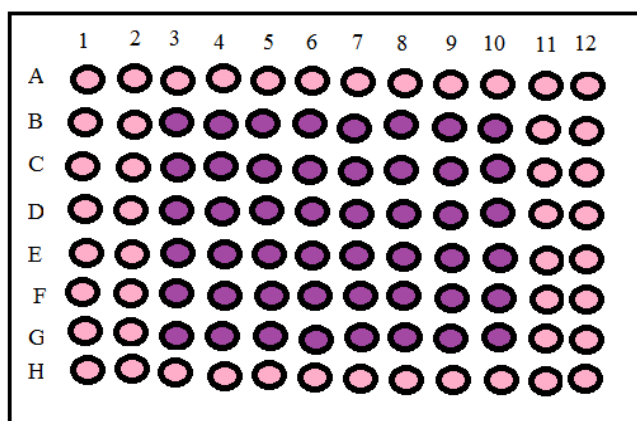
4.2.2. Nasazení buněk a ovlivnění inhibitory v testu cytotoxicity

- Pomocí analyzátoru viability buněk byl zjištěn počet buněk v suspenzi, ze kterého byl následně vypočítán objem použitý na vytvoření buněčné suspenze o konkrétním počtu buněk (viz tabulka 3)

Tabulka 2: Počty buněk nasazované na jamku u jednotlivých buněčných linií

Buněčná linie	Počet buněk na jamku
MEERtm +4oht	15 000
MEERtm -4oht	20 000
CEM	20 000
K562	15 000
MRC-5	10 000
BJ	10 000

- Objem byl doplněn kultivačním médiem obohaceným o výše popsané složky do konečného objemu 12 ml.
- Buněčná suspenze byla v objemu 100 μ l pipetována pomocí multikanálové pipety do 96-ti jamkové mikrotitrační desky dle následujícího schématu (viz obrázek 6).

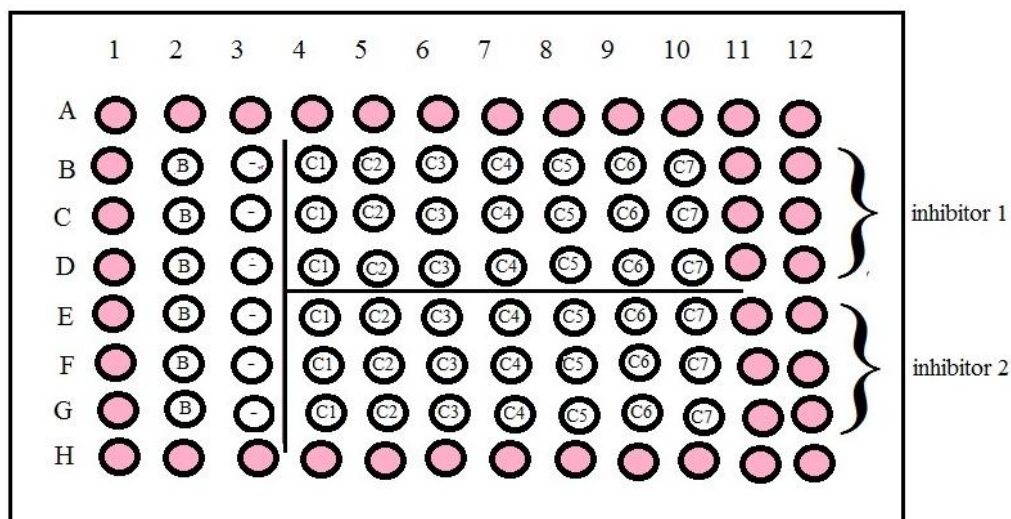


Legenda


- médium
- buňky

Obrázek 6: Schéma nasazování buněk. Okrajové buňky a sloupec č. 11 obsahovaly vždy jen čisté médium a zajišťovaly udržení stejného prostředí pro buňky během celého trvání experimentu. Sloupec č. 2 představoval blank. Ve sloupcích 3 – 10 se vždy nacházely buňky.

- Byly připraveny základní nejvyšší koncentrace inhibitorů Chk1i, Mk2i, Chk1i/Mk2i, přičemž byla vždy dodržena ještě 1,1% koncentrace DMSO. Pro inhibitor Chk1i o koncentraci 2000 nM bylo do mikrozkušavky napipetováno 898 μ l kultivačního, 2 μ l komerčního ChKi (10 mM) a 8 μ l DMSO. Dále byl připraven inhibitor Mk2i o koncentraci 8000 nM, kdy bylo do mikrozkušavky napipetováno 447 μ l kultivačního média, 4 μ l komerčního Mk2i (10 mM) a 1 μ l DMSO. V případě kombinace inhibitoru Chk1i/Mk2i byla koncentrace každého z nich stejná, jako v případě samostatných inhibitorů.
- Byla připravena koncentrační řada každého inhibitoru a jejich kombinací skládající se vždy ze 7 koncentrací. Každá následující koncentrace byla o polovinu nižší, než předcházející (viz tabulka 2). Pro experiment bylo důležité zachovat stejné podmínky pro všechny ovlivňované buňky s jedinou měnící se veličinou, kterou představovala koncentrace inhibitoru. Bylo tedy připraveno médium s 1,1% DMSO tak, že do plastové zkumavky bylo napipetováno 9,89 ml RPMI média a 110 μ l DMSO. Pro získání následující koncentrace inhibitoru bylo do mikrozkušavek napipetováno vždy 100 μ l média s 1,1% DMSO a 100 μ l předcházející koncentrace inhibitoru.
- Jednotlivé koncentrace byly pipetovány ve třech opakováních k testovaným buňkám na 96-ti jamkové mikrotitrační desce ve třech opakováních dle schématu zobrazeného na obrázku 7 (viz obrázek 7, tabulka 2). Do sloupců č. 2 a 3, představujících blank a negativní kontrolu, bylo pipetováno 10 μ l média s 1,1% DMSO pro konečnou koncentraci 0,1 %.



Legenda

-  čisté médium
- negativní kontrola (neovlivněné buňky)
- B blank (médium + 0,1% DMSO)

Obrázek 7: Schéma pipetování při ovlivňování buněk inhibitory. Každá 96-ti jamková deska byla použita k testování dvou inhibitorů. Každý inhibitor byl testován v 7 koncentracích. Sloupec č. 2 sloužil jako blank, kdy vždy obsahoval čisté médium a 0,1 % DMSO. Sloupec č. 3 představoval negativní kontrolu, přičemž tyto jamky vždy obsahovaly buňky a 0,1% DMSO.

Tabulka 3: Koncentrace inhibitorů

Označení koncentrace	C_{Chk1i} (nM)	C_{Mk2i} (nM)	$C_{\text{Chk1i/Mk2i}}$ (nM), $C_{\text{Chk1i/Parpi}}$ (nM)
C1	31	125	31/125
C2	62	250	62/250
C3	125	500	125/500
C4	250	1000	250/1000
C5	500	2000	500/2000
C6	1000	4000	1000/4000
C7	2000	8000	2000/8000

- Mikrotitrační desky byly inkubovány po dobu 3 dnů při teplotě 37°C a koncentraci CO₂ 5%.

- Pro vyhodnocení byla použita reagencie XTT, ke které byl v poměru 50:1 napipetován aktivátor XTT. Pro XTT test bylo tedy použito 12 ml XTT a 240 μ l XTT aktivátoru.
- Do každé hodnocené jamky bylo napipetováno 50 μ l XTT reagencie.
- Mikrotitrační desky byly ponechány inkubovat při 37°C a 5% koncentraci CO₂.
- Okometricky byl kontrolován stupeň zbarvení, které bylo tvořeno tetrazoliovou solí vznikající jako metabolický produkt reakce XTT s mitochondriálními enzymy viabilních buněk.
- Po dosažení požadované intenzity barevné reakce (2-4 hodiny) byly mikrotitrační desky měřeny na ELISA readeru Infinite M200 Pro při vlnové délce 630 nm pro hodnotu pozadí.
- Dále byly mikrotitrační desky měřeny při vlnové délce 475 nm pro hodnoty absorbance tetrazoliové soli obsažené v živých buňkách v konkrétní jamce.
- Výsledky byly následně zpracovány tak, že hodnoty byly nejprve očištěny o hodnotu pozadí, poté byla od hodnot odečtena průměrná absorbance blanku a hodnoty třech opakování každé koncentrace byly zprůměrovány. Toto bylo přepočteno na procenta a v posledním kroku byl vygenerován graf, ve kterém byly zohledněny také směrodatné odchylky vypočtené z konečných absorbancí tří opakování každé koncentrace.
- Následně byly jednotlivé procentuální hodnoty zprůměrovány a byl vygenerován graf informující o celkovém výsledku experimentů zkoumajících účinek inhibice předmětných kináz účastnících se drah odpovědi buněk na poškození DNA.
- V konečné fázi vyhodnocení byl vygenerován graf srovnávající výsledky experimentů prováděných na nádorových buněčných liniích a výsledky získané z kontrolních nenádorových linií.

4.2.3 Příprava fluorescenčního preparátu (cyto-spin) a fluorescenční mikroskopie

- Pomocí analyzátoru počtu a viability buněk byl zjištěn počet buněk v suspenzi, ze kterého byl následně vypočítán objem použitý na vytvoření buněčné suspenze, která obsahovala 500 000 buněk. Konkrétní objem suspenze s požadovaným počtem buněk byl pipetován do mikrozkuhavky. Mikrozkuhavky byly centrifugovány při g 200 po dobu 5 minut a pelet byl následně resuspendován ve 200 μ l RPMI média.
- Buňky byly nanесeny na podložní sklo se speciální úpravou superfrost-plus pomocí speciálních nanášecích komůrek. Následovala centrifugace při 500 RPM po dobu 2 minut.
- Podložní skla s nanесenými buňkami byla po dobu 15 minut fixována ve formaldehydu o teplotě 4°C.
- Po fixaci ve formaldehydu byla podložní skla 2x promyta v PBS pufру. V tomto kroku byla využita třepačka a každé promytí trvalo 5 minut.
- Podložní skla byla přenesena na uzavíratelnou plastovou misku a oblast s buňkami byla ohraničena voskovým fixem, což umožnilo nanášet přímo na buňky další látky využívané v této metodice přípravy fluorescenčního preparátu.
- Na buňky bylo napipetováno 300 μ l 0,2% Tritonu-20 v PBS za účelem permeabilizace buněčných membrán. Triton-20 působil po dobu 5 minut v pokojové teplotě.
- Triton-20 byl z podložních skel odstraněn vývěvou. Dále byla podložní skla 3x promyta v PBS pufру po dobu 5 minut.
- Na buňky bylo nanесeno 300 μ l 1% BSA v PBS pufру za účelem blokace nespecifických vazebných míst před aplikací primární protilátky. BSA bylo ponecháno působit po dobu 30 minut. Po 30 minutách bylo odstraněno vývěvou.
- Byla aplikována primární králičí protilátka v objemu 300 μ l, která byla předem 200x ředěna v PBS. Následovala inkubace přes noc ve vlhčené komůrce při 4°C.
- Podložní skla byla po dobu 2x 5 minut promyta v PBS s 0,1% Tweenem X-100, který byl použit za účelem zeslabení afinity protilátky k nespecifickým vazebným místům.
- Následovalo 2x promytí v čistém PBS po dobu 5 minut.

- Na podložní skla bylo napipetováno 300 μ l 1% BSA v PBS pufru, které bylo ponecháno působit po dobu 30 minut.
- Byla aplikována fluorescenčně značená sekundární anti-králičí protilátka v objemu 300 μ l, která byla předem 1000x ředěna v PBS. Podložní skla se sekundární protilátkou byla inkubována po dobu 60 minut.
- Na buňky bylo v posledním kroku aplikováno 250 μ l DNA barviva Hoechst 33342 v koncentraci 5 μ g/ml. Barvivo bylo ponecháno působit 30 minut.
- Barvivo a sekundární protilátka byly odmyty pomocí promytí 2x v PBS s 0,1% Tweenem X-100 a 2x v čistém PBS po dobu 3 minut.
- Skla byla opláchnuta v destilované vodě
- Po osušení trvajícím 10 minut byly na buňky napipetovány 3 μ l montovacího média Vectashield, na podložní skla byla přiložena skla krycí. Buňky byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu s automatickým snímáním.

4.2.4 Analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie

- Pomocí analyzátoru viability buněk byl zjištěn počet buněk v původní suspenzi, na základě čehož byla následně připravena buněčná suspenze s požadovaným počtem buněk.
- Buněčná suspenze byla v objemu 2 ml napipetována do 5 jamek na desce o 6 jamkách.
- K buňkám byly napipetovány inhibitory Chk1i v koncentraci 2000 μ M, Mk2i v koncentraci 8000 μ M, jejich kombinace a kombinace Chk1i/Mk2i. Do poslední jamky bylo napipetováno DMSO v koncentraci 0,1%.
- Po uplynutí 24 hodinové inkubace byly buňky fixovány v chazeném 70% etanolu. Ponecháno působit po přes nov při 4°C.
- Pro odstranění fixativa byly buňky na sklíčku 2x promyty PBS s 1% BSA. Následovala centrifugace při 270 g po dobu 5 minut. Supernatant byl odsán.
- DNA buněk byla barvena propidium jodidem. Pelet získaný v přecházejícím kroku byl resuspendován v 300 μ l barvicího roztoku propidium jodidu o koncentraci 50 μ l/ml. Tento roztok obsahoval také RNázu A o koncentraci 100 μ l/ml v PBS.
- Po inkubaci při 20°C a trvajícím 20 minut a následném chlazení byly jednotlivé vzorky analyzovány na průtokovém cytometru. Byl použit laser o vlnové délce

488 nm pro excitaci a fluorescenční signál byl detekován po průchodu filtrem 586/42 nm. Výstupem zde byly grafy ukazující rozdíly v procentuálním zastoupení subG1 buněk a v rozložení fází buněčného cyklu u buněk ovlivněných jednotlivými inhibitory a jejich kombinacemi a buněk v jamce, ve které bylo přítomno pouze DMSO.

5 Výsledky

Předmětem experimentální části této práce je testování, zda inhibice drah odpovědi buněk na poškození DNA za podmínek replikačního stresu u nádorových buněk působí na takto ovlivněné buněčné kultury snížením viability. V dalším kroku byly testované buněčné linie srovnány s buněčnými liniemi reprezentujícími tkáň nenádorové. Jednou z nejdůležitějších částí této práce bylo otestování účinků inhibice signálních drah odpovědi buněk na poškození DNA u leukemických linií kombinací inhibitorů Chk1i a Mk2i. Dále bylo důležité srovnání s účinky, které mělo použití pouze Chk1i. Existuje studie, jež ukazuje, že kombinace Chk1i/Mk2i je účinnější než pouze inhibitor Chk1i, kdy jde o synergický vztah těchto dvou látek. V této studii jsou závěry podpořeny výsledky experimentů prováděných na několika buněčných liniích. Další testované linie ovšem tyto závěry nepotvrdily a prokázaly se u nich pouze aditivní účinky Mk2i inhibitoru k účinkům inhibitoru Chk1 (*Dietlein et al., 2015*).

5.1 Analýza výsledků ovlivnění MII-ENL-ERtm myší buněčné linie

V první fázi experimentální části této práce byla testována buněčná linie MII-ENL-ERtm (MEERtm) s plně exprimovaným onkogenem a následně byla porovnána s citlivostí kultury MEERtm s utlumenou expresí onkogenu.

Kombinace inhibitorů Chk1/Mk2i se v experimentu ukázala být velice účinná, kdy na grafu 1 (viz graf 1) je patrné, že buňky kultivované v médiu s 4-oht (+4oht) a ovlivněné kombinací o nejvyšší koncentraci (2000/8000 nM) vykazovaly viabilitu velice se blížící 0 %. Lze tedy odvodit závěr, který říká, že nádorové buňky jsou silně závislé na signální dráze ATR/Chk1 ve své snaze napravit DNA poškozenou v důsledku replikačního stresu.

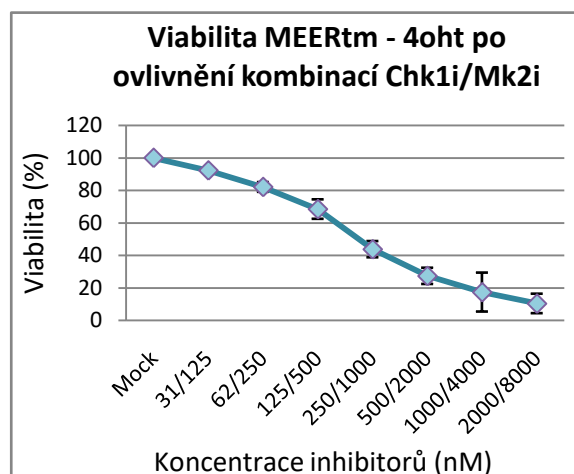
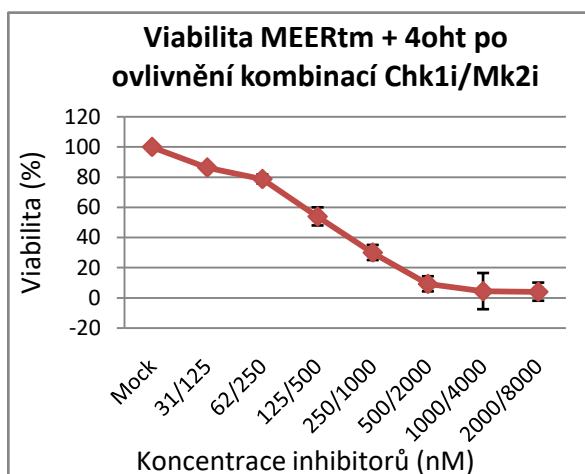
Jako kontrola byla v tomto experimentu použita buněčná kultura MEERtm udržovaná v médiu bez 4-hydroxytamoxifenu (- 4oht). V případě buněk kultivovaných bez 4-oht byla viabilita buněk ovlivněných nejvyšší koncentrací (2000/8000 nM) 10 %. Rozdíl viabilit dosahovaných MEERtm kultivovaných v médiu s 4-oht a bez 4-oht

nebyl opět příliš přesvědčivý, kdy maximální rozdíl dosahoval přibližně 18 % (viz graf 2).

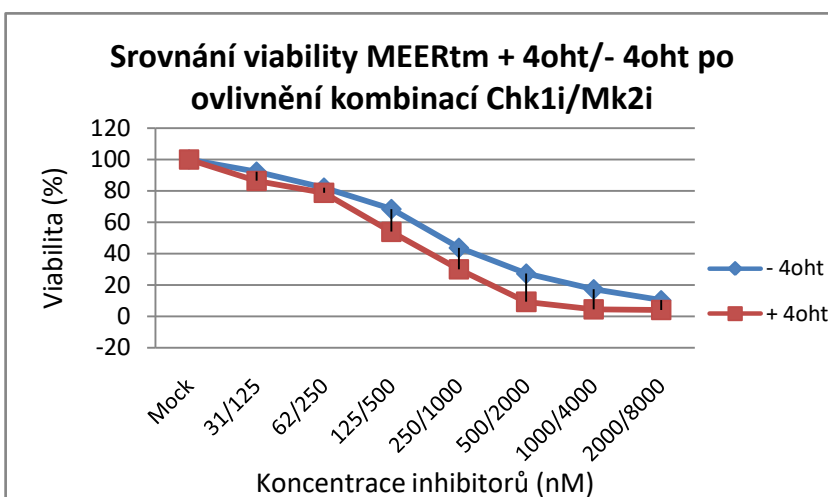
Při srovnání účinků inhibitoru Chk1i a kombinace Chk1i/Mk2i šlo vždy jen o aditivní účinek Mk2i při porovnání viabilit buněk ovlivněných buď samotným Chk1i nebo kombinací Chk1i/Mk2i (viz graf 1 a graf 4). Porovnání účinků samotného inhibitoru Chk1i a kombinace inhibitorů Chk1i/Mk2i přineslo poznatek, že tyto leukemické linie s fúzním onkogenem MII-ENL nepatří mezi ty buněčné linie, u nichž se účinek inhibice signálních drah pomocí kombinace inhibitorů násobí oproti účinkům inhibice ovlivněním jen Chk1i.

Graf 1: Viabilita MEERtm kultivovaných s 4-oht po ovlivnění inhibitory Chk1i/Mk2i

Graf 2: Viabilita MEERtm kultivovaný s 4- bez 4-oht po ovlivnění inhibitory Chk1i/Mk2i



Graf 3: Srovnání viability MEERtm kultivovaných s 4-oht a bez 4-oht po ovlivnění inhibitory Chk1i a Mk2i

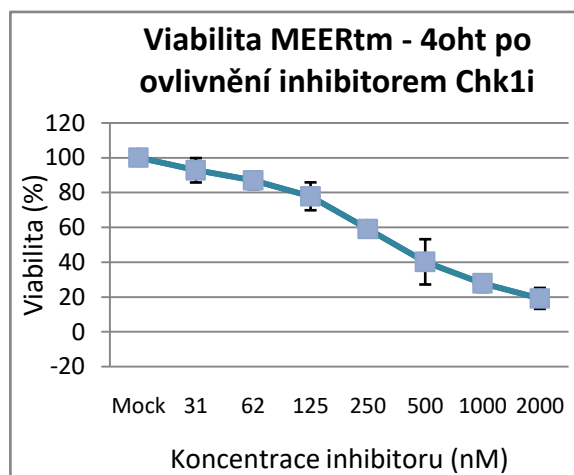
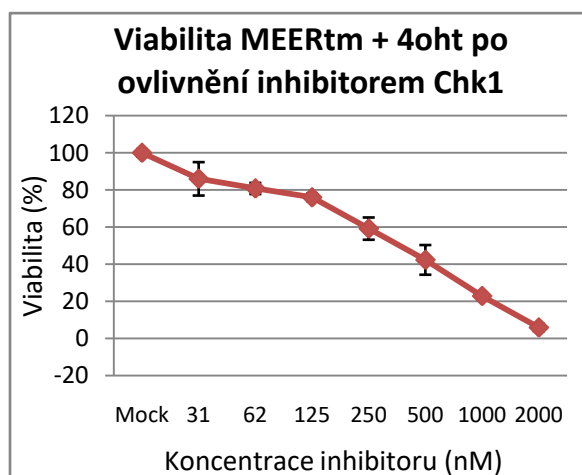


Inhibitor Chk1 kinázy se v testech ukázal být velice účinný. Viabilita buněk ovlivněných nejvyšší koncentrací inhibitoru (2000 nM), které byly kultivované v médiu s 4-hydroxytamoxifenem se po 3 dnech kultivace od ovlivnění ve všech 4 provedených experimentech vždy blížila hodnotě 0 %. Je tedy možné říci, že inhibice Chk1 kinázy zásadní měrou přispívá k tomu, aby nádorové buňky, jejichž typickou vlastností je vysoká míra replikačního stresu, byly výrazně omezeny ve schopnosti eliminovat důsledky takto výrazného zasažení replikačním stresem (viz graf 4).

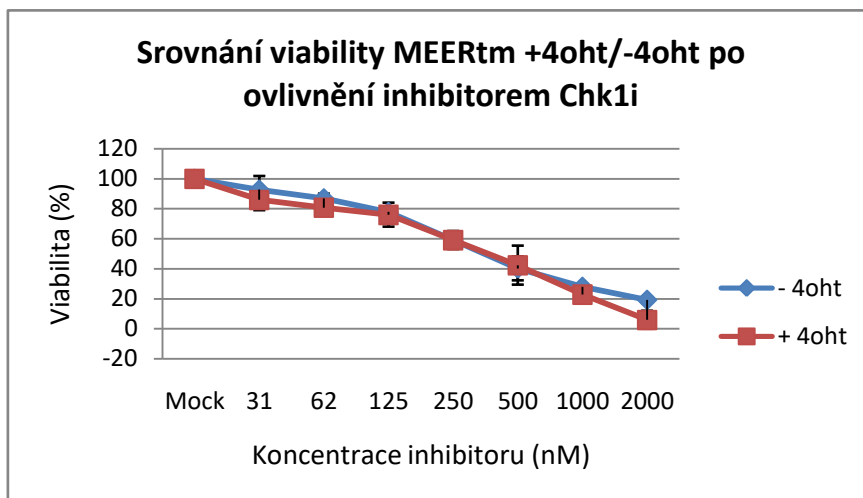
V případě MEERtm -4oht ovlivněných nejvyšší koncentrací inhibitoru vykazovaly viabilitu 19 % (viz graf 5). Při srovnání těchto dvou linií, byla situace taková, že rozdíl viabilit byl maximálně 5% v nižších koncentracích a rozdíl 14 % bylo pozorováno u buněk ovlivněných nejvyšší koncentrací (2000 nM). Celkově lze tedy říci, že hodnoty viability obou srovnávaných verzí linie MEERtm se pohybovaly v rámci směrodatných odchylek a výsledky srovnání nebyly příliš přesvědčivé, neboť rozdíl ve viabilitách nádorové buněčné linie a kontroly blížící se kontrole ideální by bylo možno předpokládat rozdíly výraznější (viz graf 6).

Graf 4: Viabilita MEERtm kultivovaných s 4-oht po ovlivnění inhibitorem Chk1i

Graf 5: Viabilita MEERtm kultivovaných bez 4-oht po ovlivnění inhibitorem Chk1i



Graf 6: Srovnání viability MEERtm kultivovaných s 4-oht a bez 4-oht po ovlivnění inhibítorem Chk1i



Dále byl testován inhibítor Mk2 kinázy. Zde účinnost nebyla příliš vysoká, neboť u buněk udržovaných v médiu s 4-hydroxytamoxifenem byla viability MEERtm ovlivněných nejvyšší koncentrací (8000 nM) 62 % při měření po 3 denní kultivaci. Sumární výsledek všech 4 provedených experimentů je možno shlédnout v grafu (viz graf 7). Je tedy možno říci, že inhibice Mk2 kinázy, jakožto jediný zásah do fungování nádorové buňky, není úplně dostačující při snaze eliminovat nástroje, kterými se buňka vyrovnává s replikačním stresem.

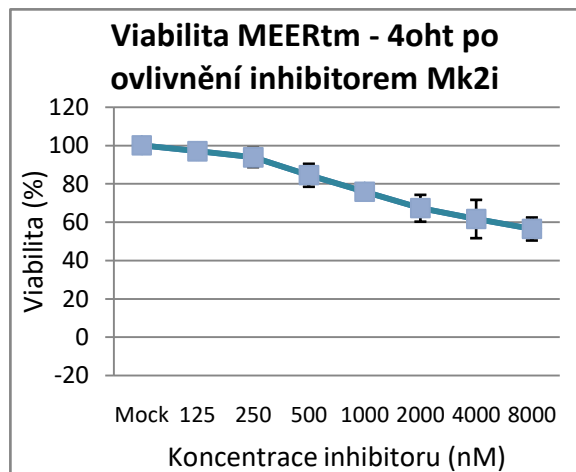
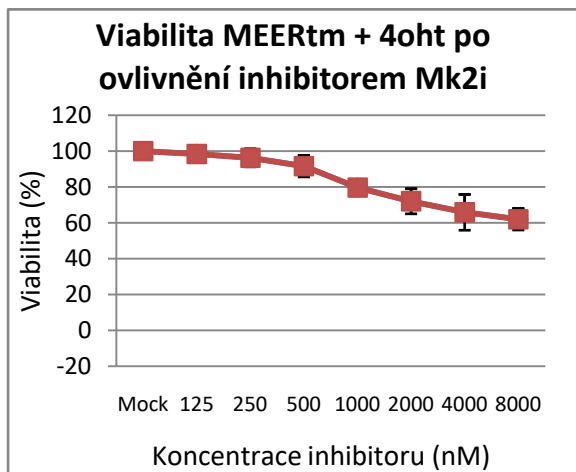
V případě buněk kultivovaných bez 4-hydroxytamoxifenu klesala viability velmi podobně, jako u buněk udržovaných v médiu s 4-hydroxytamoxifenem. Tedy MEERtm ovlivněné nejvyšší koncentrací inhibítora Mk2i (8000 nM) vykazovali viability 56 % (viz graf 8). Zde se tedy rozdíly viabilit obou srovnávaných verzí testované buněčné linie jednoznačně pohybovaly v rámci směrodatných odchylek.

Přesto i u viabilit rozdílných pouze v rámci směrodatných odchylek lze pozorovat jev, kdy po ovlivnění inhibítorem Mk2i je viability buněk s plně exprimovaným onkogmem, s typicky vysokou mírou replikačního stresu, vyšší, než viability buněk, ve kterých onkogen exprimován není. (viz graf 9). Tento jev je možno vysvětlit skutečností, že MEERtm je uměle vytvořený buněčný model, který je během své proliferace již do vysoké míry závislý na dodávce tamoxifenu či 4-hydroxytamoxifenu. Čili pokud je při kultivaci tamoxifen nepřítomen, tak nejen, že

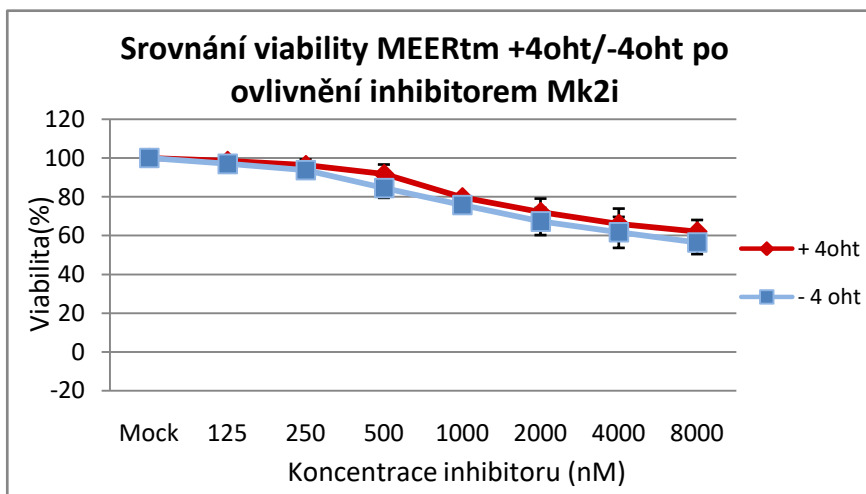
dojde ke snížení exprese genu MII-ENL-ERtm, ale je ovlivněna i celková schopnost buněk dále prosperovat (dále viz kapitola 6).

Graf 7: Viabilita MEERtm kultivovaných s 4-ohť po ovlivnění inhibitorem Mk2i

Graf 8: Viabilita MEERtm kultivovaných bez 4-ohť po ovlivnění inhibitorem Mk2i

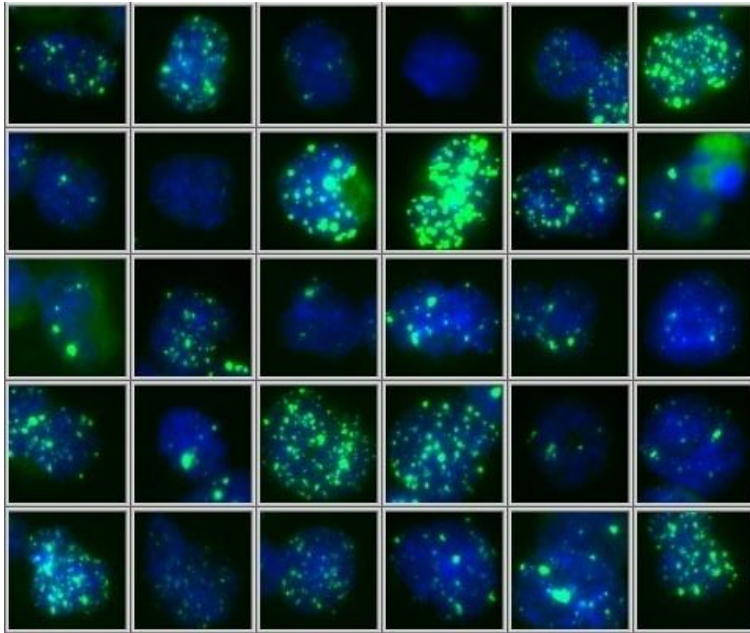


Graf 9: Srovnání viability MEERtm kultivovaných s 4-ohť a bez 4-ohť po ovlivnění inhibitorem Mk2i

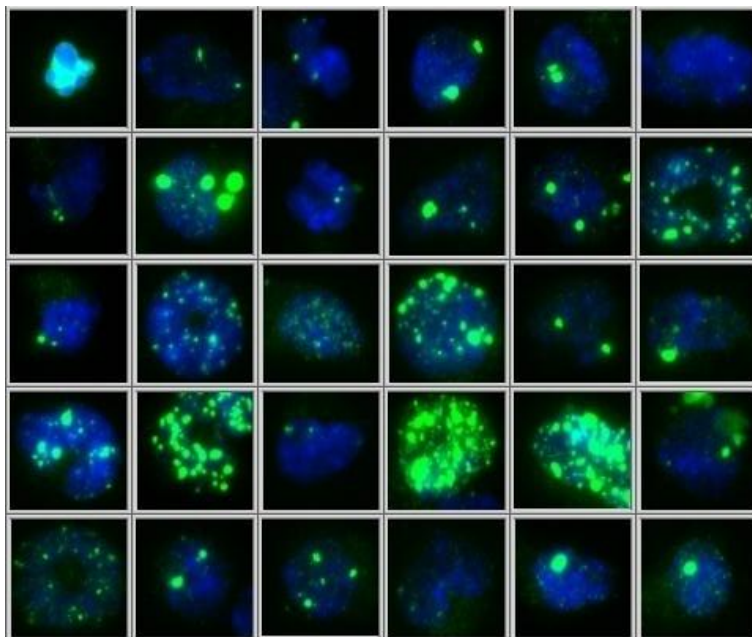


5.2 Potvrzení přítomnosti poškozené DNA u buněk linie MII-ENL-ER_{tm} (MEER_{tm})

Na následujících obrázcích (viz obrázek 7 a 8) je možno vidět DNA buněk MEER_{tm} zbarvenou fluorescenčně jako modré signály. Dále jsou zde patrné zelené signály znázorňující fokusy fosforylovaného histonu γH2AX. Tato konkrétní varianta daného histonu je jedním z typických markerů poškození DNA. Z obrázků je patrné, že DNA buněk MEER_{tm} +4oht je poměrně bohatá na tyto signály a při srovnání s linií MEE_{tm} -4oht je výsledek velice podobný. Fakt, že oba typy buněk vykazují přibližně stejnou míru poškození DNA lze vysvětlit tak, že obě varianty MEER_{tm} pocházejí z jedné kultury pěstované v přítomnosti tamoxifenu. Závěrečná kultivace buněk kultury MEER_{tm} - 4oht bez 4-hydroxytamoxifenu, která probíhala jen po krátkou časovou periodu pravděpodobně nedostačovala na to, aby se efekt snížení exprese onkogenu projevil na snížení míry poškození DNA. Lze tedy říci, že dle těchto výsledných obrázků je DNA nádorových buněčných linií zasažena poměrně vysokou mírou poškození.



Obrázek 8: *Histon qH2AX jako marker poškozené DNA u buněk MEERtm +4oht*



Obrázek 9: *Histon qH2AX jako marker poškozené DNA u buněk MEERtm -4oht*

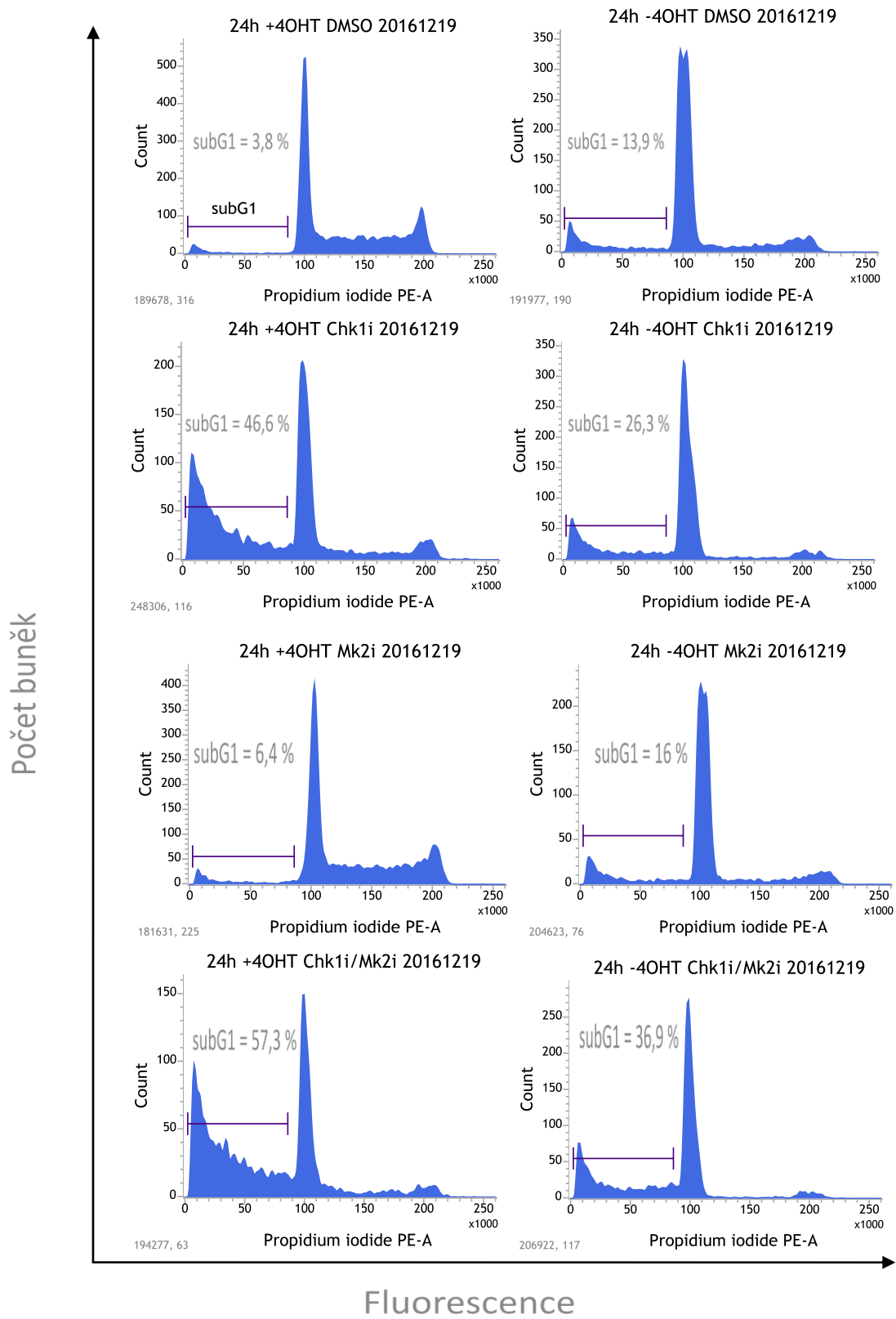
5.3 Procentuální zastoupení subG1 u MEERtm ovlivněných jednotlivými inhibitory a rozložení buněk ve fázích buněčného cyklu

Po zjištění, že obě varianty MEERtm linie jsou zasaženy přibližně stejnou mírou replikačního stresu a provedení XTT testování, dle kterého neexistuje výrazný rozdíl v citlivosti mezi MEERtm +4oht a MEERtm -4oht po 72 hodinové kultivaci, následovalo otestování stavu obou variant po kratší době kultivace buněk ovlivněných inhibitory. Po ovlivnění nejvyššími koncentracemi inhibitorů a analýze průtokovým cytometrem je možné konstatovat míru zastoupení subG1 buněk u každé testované verze. Buňky označované subG1 jsou buňky mrtvé, kdy je pravděpodobná apoptóza. Ze souboru grafů uvedeného níže (viz souhrn grafů 10) je možno vyvodit závěr, že MEERtm -4oht bez treatmentu mají vyšší procento subG1 buněk než MEERtm kultivované v médiu s 4-hydroxytamoxifenem. Po ovlivnění trvajícím 24 h bylo naopak více buněk subG1 v kultuře MEERtm kultivované s tamoxifenem, což značí, že po ovlivnění identickými inhibitory jsou buňky s plně exprimovaným fúzním genem MII-ENL-ER více citlivé k inhibici a jejich viabilita klesá rychleji. Tento fakt lze pozorovat při srovnání procentuálního zastoupení subG1 u kontroly (DMSO) a buněčné kultury ovlivněné Chk1i, kdy tento rozdíl činí u MEERtm +4oht 42 %, přičemž u MEERtm -4oht činil rozdíl pouze 12 %.

Je tedy možné říci, že časový aspekt je zde velice důležitý, neboť po 72 hodinové kultivaci buněk ovlivněných jednotlivými inhibitory odpovědi na poškození DNA a následně analyzovaných v XTT testu je patrné, že viabilita obou buněčných kultur (+4oht a -4oht) je velice nízká. Zároveň je z výsledků možno vyvodit závěr, že po 24 hodinovém ovlivnění umírají buňky s plně exprimovaným onkogenem rychleji.

Co se týká distribuce buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu, G1 fáze je zobrazena v hodnotě 100 na grafech. V této fázi buněčného cyklu se ve všech testovaných variantách nacházela většina buněk. Dále v hodnotě 200 je na grafech zobrazena fáze G2 buněčného cyklu, v níž se nacházela podstatně menší část buněk ve všech testovaných variantách. Oblast mezi těmito dvěma body zahrnuje buňky procházející dělením. SubG1 buňky, jejichž povaha a zastoupení je charakterizováno výše, jsou reprezentovány v levé části každého grafu (viz souhrn grafů 10).

Souhrn grafů 10: Distribuce buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu + subG1



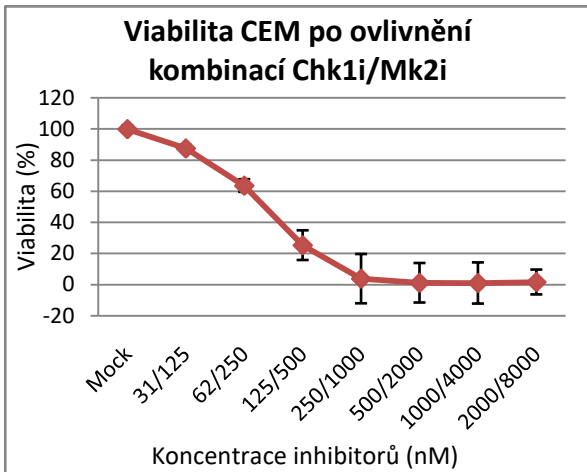
5.4 Analýza výsledků ovlivnění buněčných linií odvozených z buněk leukemické tkáně

Dále byly v experimentální části této práce otestovány leukemické buněčné linie CEM a K562. V dalším kroku byly tyto srovnány s buněčnými liniemi BJ a MRC-5 reprezentujícími tkáň nenádorové.

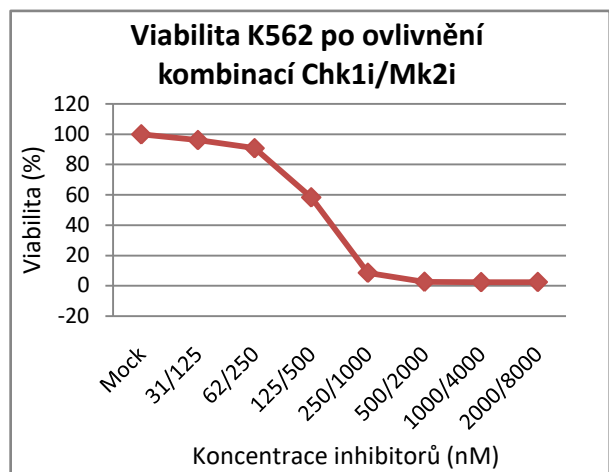
Kombinace inhibitorů Chk1/Mk2i se v experimentu ukázala být velice účinná, kdy buňky obou testovaných leukemických linií ovlivněné kombinací o nejvyšší koncentraci (2000/8000 nM) vykazovaly viabilitu velice se blížící 0 % (viz graf 11 a 12). Je tedy možno říci, že buňky leukemické tkáně jsou silně závislé na korektní funkci dráhy, jejíž součástí je Chk1i kináza, ve své snaze napravovat DNA poškozenou v důsledku replikačního stresu. U buněčných linií MRC-5 a BJ reprezentujících nenádorovou tkáň klesla viabilita po ovlivnění kombinací inhibitorů jen nepatrně (viz graf 13 a 14). Po porovnání viabilit leukemických buněčných linií a buněčných linií sloužících jako kontroly je možno říci, že rozdíl zde byl velice přesvědčivý a dosahoval přibližně 85 % (viz grafy 15, 16, 17, 18).

Při srovnání účinků inhibitoru Chk1i a kombinace Chk1i/Mk2i šlo spíše o aditivní účinek Mk2i při porovnání viabilit buněk ovlivněných buď samotným Chk1i nebo kombinací Chk1i/Mk2i. Porovnání viability buněk ovlivněných koncentrací inhibitorů 250 nM ukázalo rozdíl okolo 20 % u linie CEM i K562. (viz graf 11, 12, 19, 20). Porovnání účinků samotného inhibitoru Chk1i a kombinace inhibitorů Chk1i/Mk2i přineslo poznatek, že konkrétně testované leukemické linie nepatří mezi ty buněčné linie, u nichž se účinek inhibice signálních drah pomocí kombinace inhibitorů násobí oproti účinkům inhibice ovlivněním jen Chk1i.

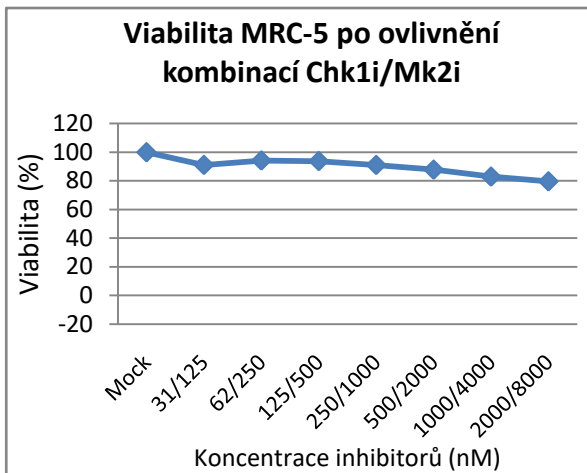
Graf 11: Viabilita CEM po ovlivnění kombinací Chk1i/Mk2i



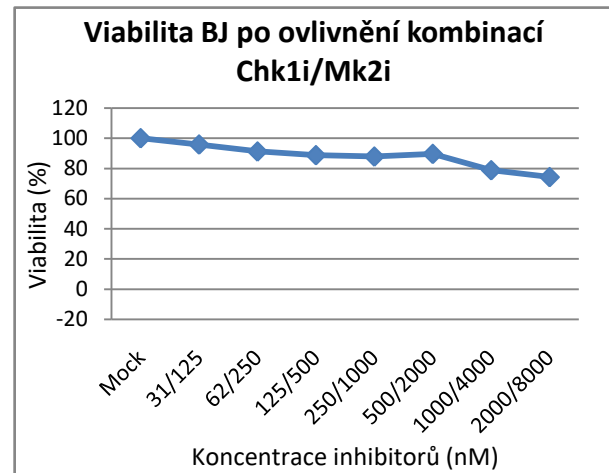
Graf 12: Viabilita K562 po ovlivnění ovlivnění kombinací Chk1i/Mk2i



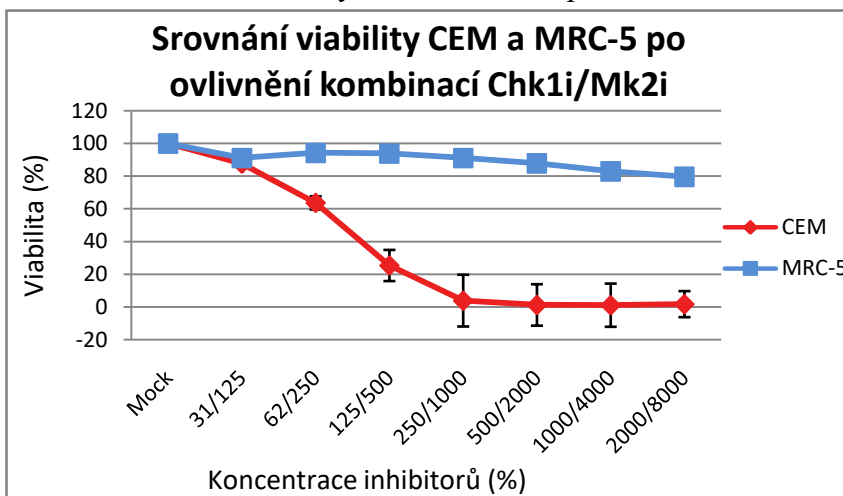
Graf 13: Viabilita MRC-5 po ovlivnění kombinací Chk1i/Mk2i



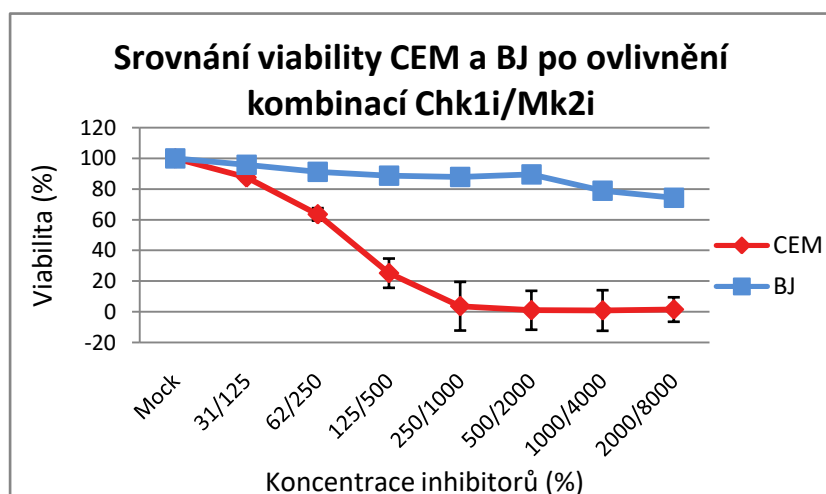
Graf 14: Viabilita BJ po ovlivnění ovlivnění kombinací Chk1i/Mk2i



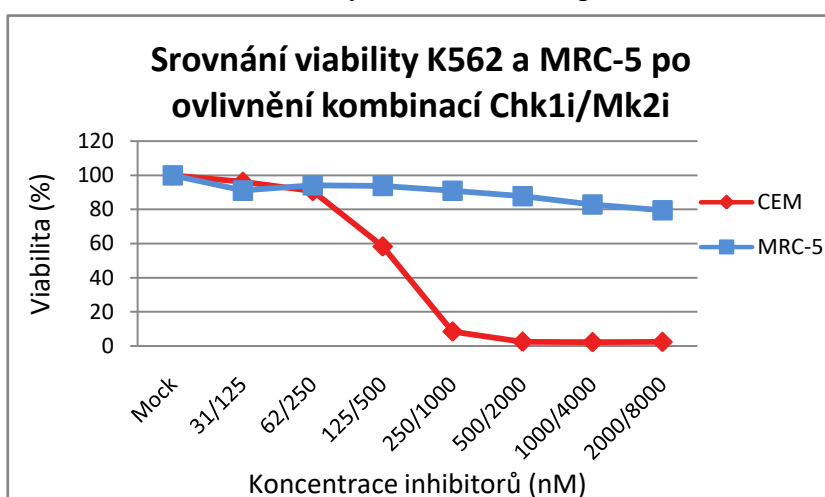
Graf 15: Srovnání viability CEM a MRC-5 po ovlivnění kombinací Chk1i/Mk2i



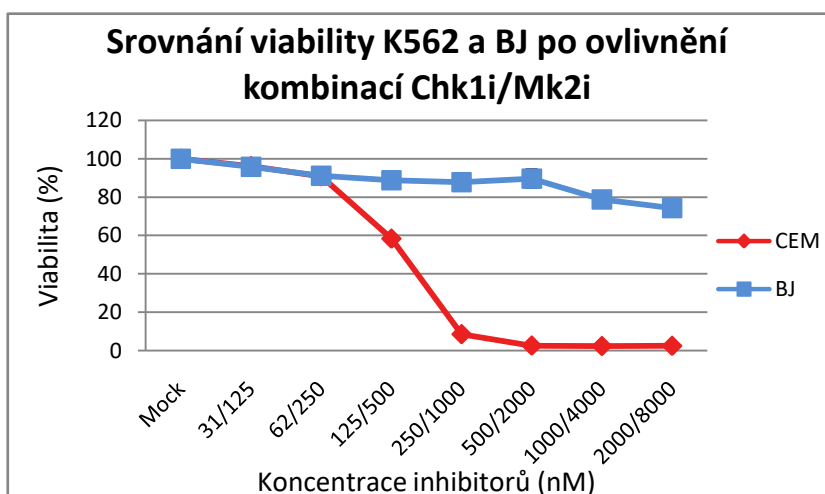
Graf 16: Srovnání viability CEM a BJ po ovlivnění kombinací Chk1i/Mk2i



Graf 17: Srovnání viability K562 a MRC-5 po ovlivnění kombinací Chk1i/Mk2i



Graf 18: Srovnání viability K562 a BJ po ovlivnění kombinací Chk1i/Mk2i

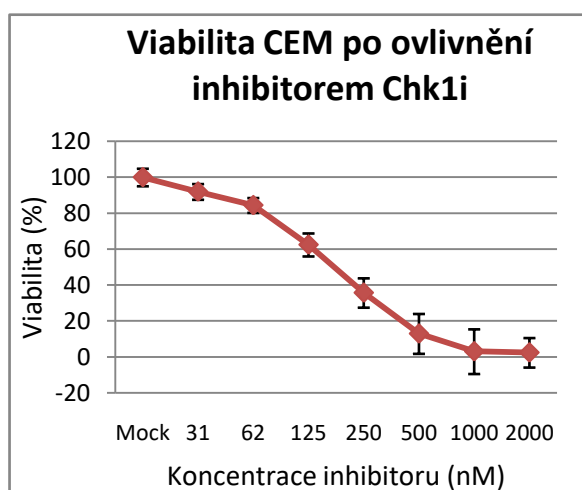


Po ovlivnění inhibitorem Chk1 kinázy je dle výsledků možno konstatovat, že účinek tohoto inhibitoru byl tak, jako u buněčné linie MEERtm, velice přesvědčivý. Buňky obou testovaných linií ovlivněné nejvyšší koncentrací inhibitoru (2000 nM) vykazovaly po 3 dny trvající kultivaci viabilitu blížící se 0 % (viz graf 19 a 20).

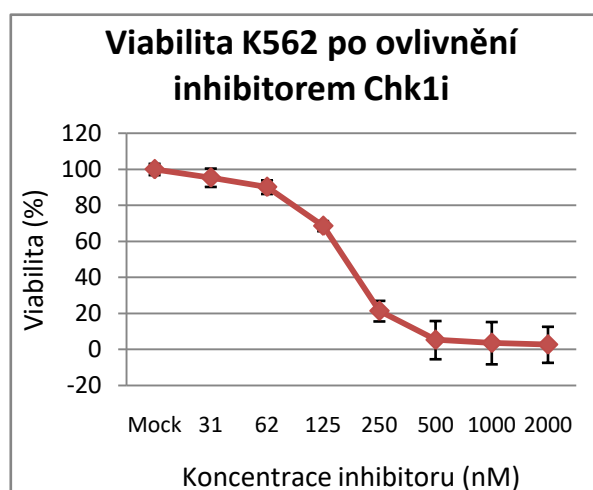
Jako kontrola zde byly použity buněčné linie BJ a MRC-5 reprezentující nenádorové tkáně. Ty vykazovaly viabilitu výrazně vyšší ve srovnání s nádorovými liniemi (viz graf 21 a 23). Porovnání linie MRC-5 a obou testovaných leukemických buněčných linií ukázalo, že u buněk ovlivněných Chk1 o koncentraci 250 nM, která leží ve středu koncentrační řady, byl v případě linie CEM rozdíl 65 % a u linie K562 rozdíl 75 % (graf 23 a 24). V případě linie BJ byl při porovnání s linií CEM při ovlivnění inhibitorem Chk1 ($c = 250$ nM) rozdíl 45 % a při porovnání s K562 ovlivněných Chk1 ($c = 250$ nM) byl rozdíl 75 % (viz graf 25 a 26).

Dle těchto výsledků lze tedy vyvodit závěry, že inhibice Chk1 kinázy má dalekosáhlé důsledky na životaschopnost buněk nádorových tkání a v porovnání s účinky na buňky tkání nenádorových jsou tyto účinky o mnoho výraznější, kdy ani nejvyšší koncentrace inhibitoru nezapříčinila výraznější pokles viability.

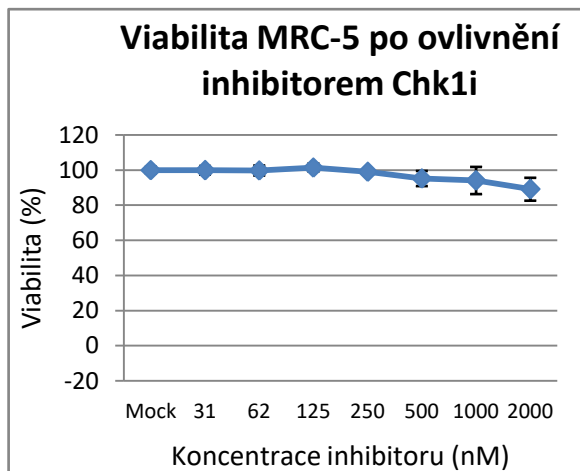
Graf 19: Viabilita CEM po ovlivnění inhibitorem Chk1



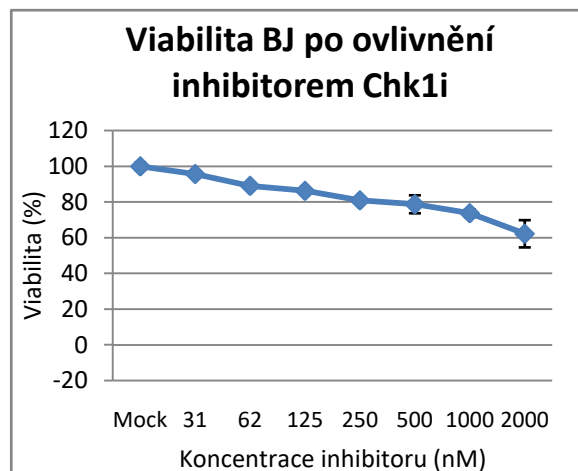
Graf 20: Viabilita K562 po ovlivnění inhibitorem Chk1



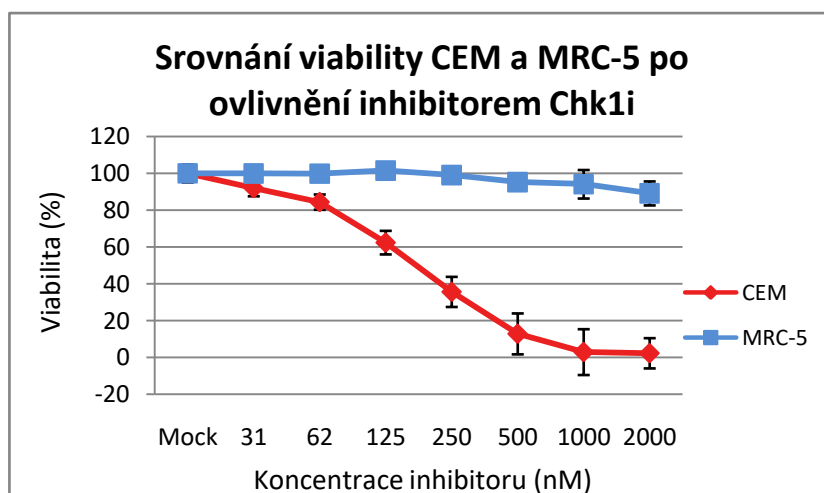
Graf 21: Viabilita MRC-5 po ovlivnění inhibítorem Chk1i



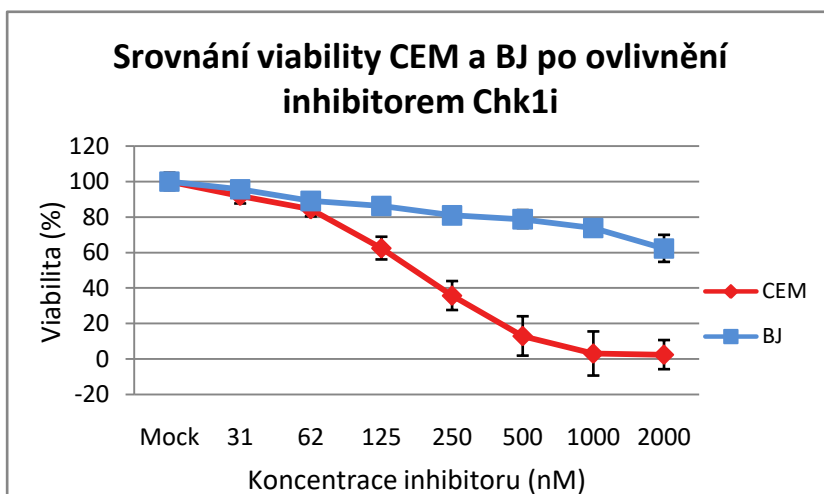
Graf 22: Viabilita BJ po ovlivnění inhibítorem Chk1i



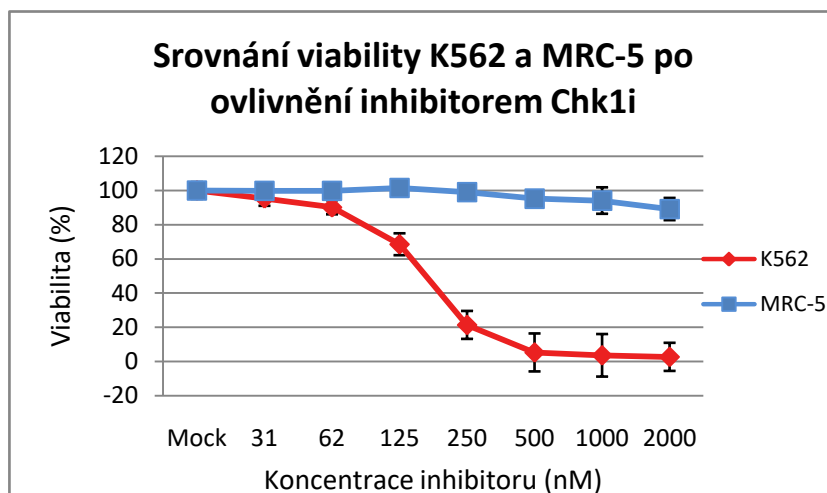
Graf 23: Srovnání viability CEM a MRC-5 po ovlivnění inhibítorem Chk1i



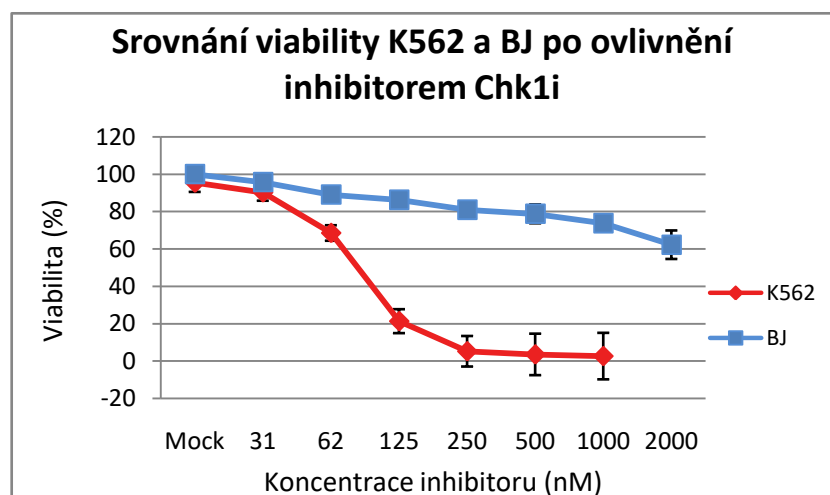
Graf 24: Srovnání viability CEM a BJ po ovlivnění inhibítorem Chk1i



Graf 25: Srovnání viability K562 a MRC-5 po ovlivnění inhibitorem Chk1i

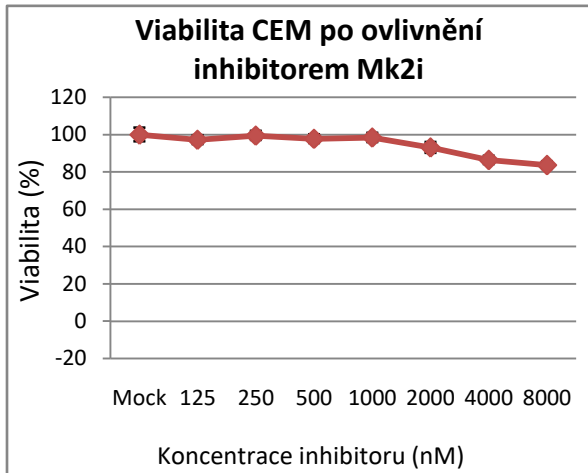


Graf 26: Srovnání viability K562 a BJ po ovlivnění inhibitorem Chk1i

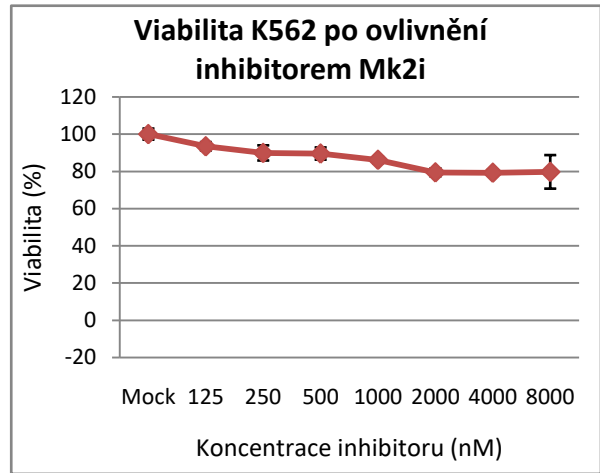


V případě inhibitoru Mk2i je nutné konstatovat, že dle těchto provedených experimentů jeho inhibice nemá na viabilitu buněk tkáně nádorové i nenádorové příliš výrazný vliv. U všech 4 buněčných linií klesla pouze maximálně o 20 %. Při srovnání účinků inhibice na buněčné linie reprezentující nádorovou a nenádorovou tkáň byly účinky srovnatelné (viz grafy 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34).

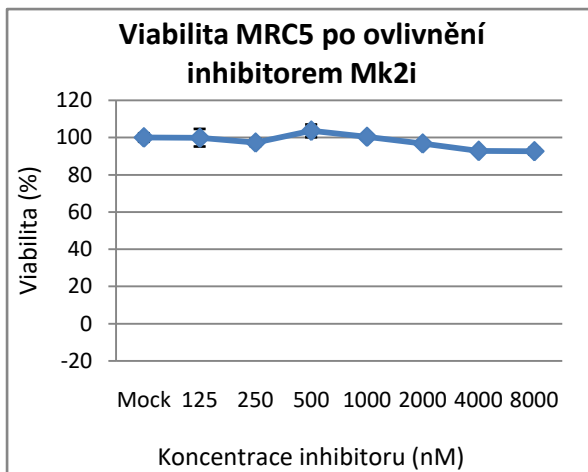
Graf 27: Viabilita CEM po ovlivnění inhibítorem inhibítorem Mk2i



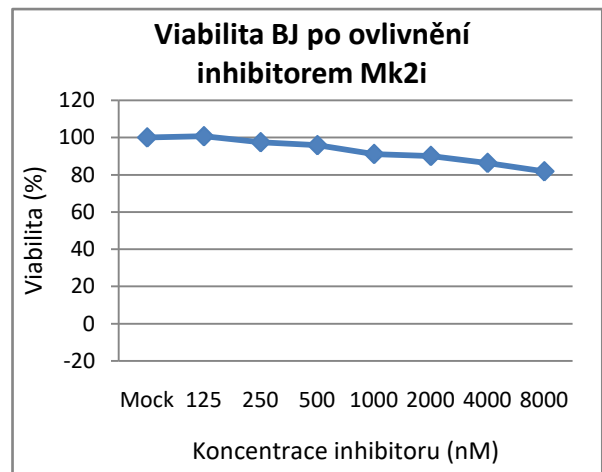
Graf 28: Viabilita K562 po ovlivnění ovlivnění inhibítorem Mk2i



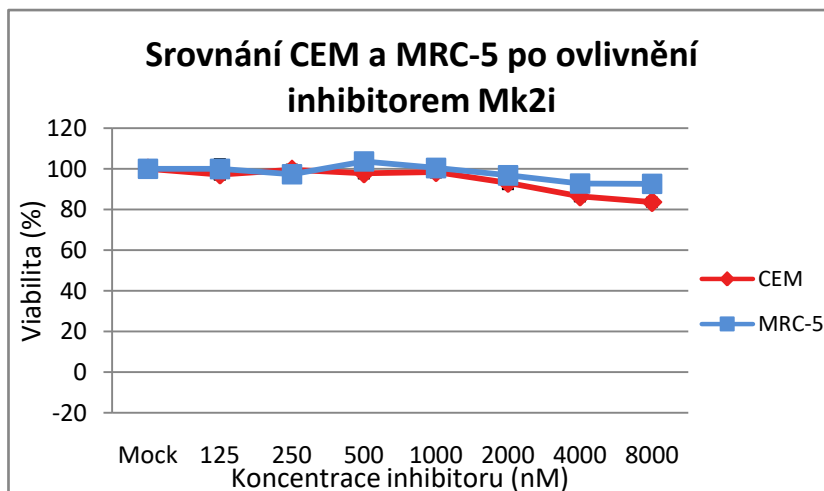
Graf 29: Viabilita MRC-5 po ovlivnění inhibítorem Mk2i



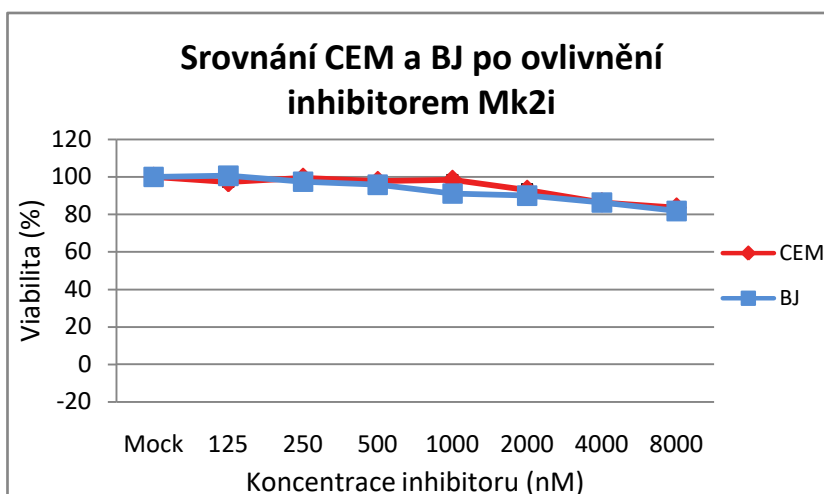
Graf 30: Viabilita BJ po ovlivnění ovlivnění inhibítorem Mk2i



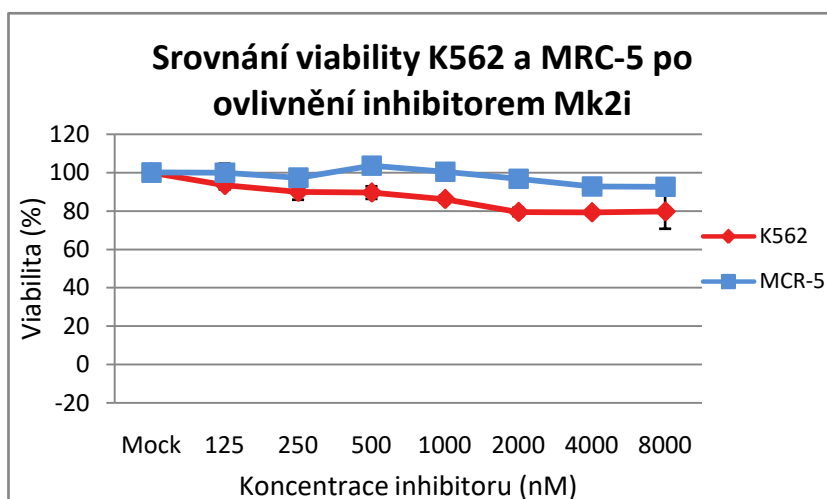
Graf 31: Srovnání viability CEM a MRC-5 po ovlivnění inhibítorem Mk2i



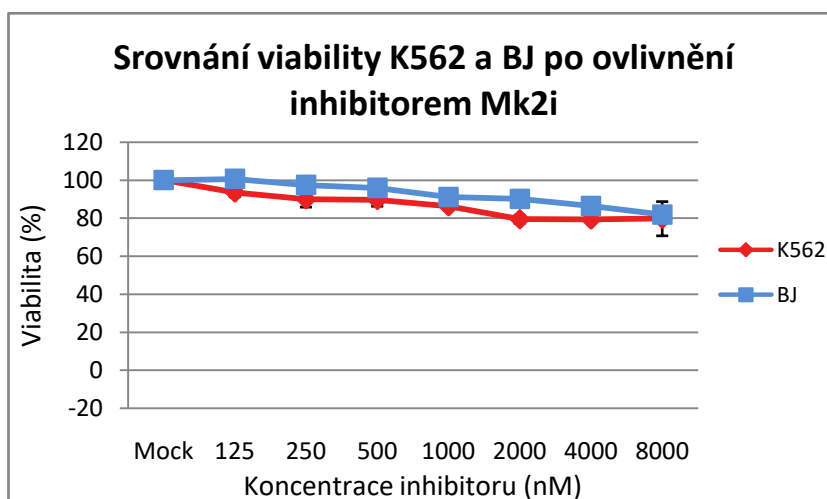
Graf 32: Srovnání viability CEM a BJ po ovlivnění inhibitorem Mk2i



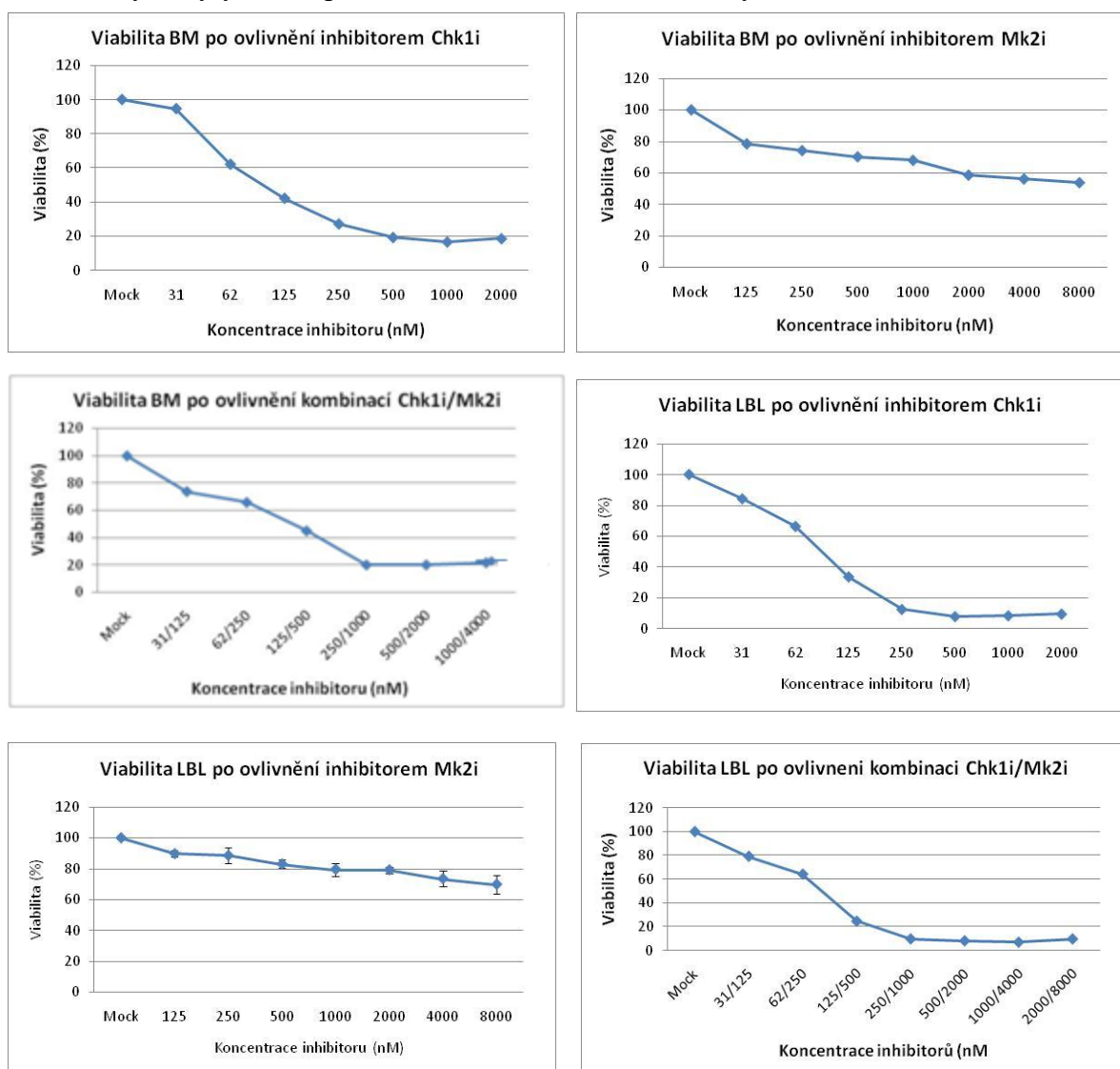
Graf 33: Srovnání viability K562 a MRC-5 po ovlivnění inhibitorem Mk2i



Graf 34: Srovnání viability K562 a BJ po ovlivnění inhibitorem Mk2i



V rámci experimentu byla důležitým aspektem kontrola reprezentující nenádorovou tkáň, jejíž výsledky srovnány s výsledky testovaných leukemických linií by poskytly informaci o tom, jak velký bude rozdíl ve schopnosti vyrovnat se s podmínkami experimentu mezi těmito dvěma biologickými modely. V průběhu práce bylo nutno vyzkoušet několik možností za účelem získání vhodné kontroly. První z nich byly zdravé lidské buňky kostní dřeně pocházející z pacienta, dále se jednalo o immortalizovanou lymfoblastoidní linii LBL odvozenou ze zdravých lidských lymfocytů (viz obrázek 9). Poslední byly lymfocyty izolované z periferní krve, u kterých ale hodnoty nebyly vůbec použitelné z důvodu nízké viability buněk.



Obrázek 9: Náhled grafů znázorňujících změnu viability po ovlivnění inhibitory Chk1i, Mk2i a jejich kombinací u buněk kostní dřeně (BM) a immortalizované buněčné linie LBL

6 Diskuze

Tato práce je věnována několika otázkám, které se týkají inhibice signálních drah odpovědi buněk na poškození DNA. Zaprvé je zde otázka, zda má inhibice drah odpovědi na replikační stres efekt na viabilitu nádorových buněk a jak výrazný tento efekt je. Následovalo srovnání reakce kultury buněk nádorových s kulturou buněk nenádorových na inhibici. Pozornost je věnována také faktu prezentovanému ve studii Dietleina a kolektivu, která říká, že pokud je simultánně použit Chk1i a Mk2i, lze u jistých buněčných linií pozorovat vyšší účinnost této kombinace ve srovnání s Chk1i inhibítorem, což je charakterizováno jako synergismus (*Dietlein et al., 2015*). Úkolem práce bylo otestovat, zda je tato skutečnost aplikovatelná i na buněčné kultury odvozené z leukemických buněk.

Experimentální část byla zahájena testováním kultury myších leukemických buněk MEERtm, kdy jedna kultura byla udržována v médiu s 4-hydroxytamoxifenem a druhá kultura, sloužící jako kontrola, byla udržována v médiu bez 4-hydroxytamoxifenu. Provedené buněčné eseje spočívaly v ovlivnění buněk koncentrační řadou kombinace inhibitorů Chk1i/MK2i a každého z těchto inhibitorů zvlášť. Po 72 hodinové kultivaci byl proveden test XTT, kdy bylo možno na základě naměřené absorbance zjistit viabilitu buněk v jednotlivých jamkách.

Vzhledem k tomu, že po 72 hodinové kultivaci bylo možno říci, že nádorové buňky jsou velice citlivé na inhibice dráhy ATR-Chk1 a také při kombinaci inhibitorů Chk1i/Mk2i byla viabilita velice nízká, kdy se jednalo o aditivní účinek Mk2i. Ovšem test XTT neukázal nijak výrazný rozdíl mezi viabilitou MEERtm +4oht a MEERtm - 4oht, proto bylo přistoupeno k ověření míry výskytu poškození DNA signalizující míru replikačního stresu, kterým jsou buňky zasaženy. Byly tedy vytvořeny fluorescenční preparáty, kde byl fluorescenčně značen histon gH2AX jako marker poškození DNA. Zde se ukázalo, že obě kultury, ať už byl v médiu 4oht či ne, vykazovaly velice podobnou hladinu fosforylovaného histonu značícího poškození DNA. Znamená to, že 7 – 8 dní trvající kultivace bez 4-oht v kultivačním médiu, což zajistí utlumení exprese fúzního onkogenu Mll- ENL nevede ke snížení míry poškození DNA, přestože je značně snížena proliferace buněčné kultury. Toto je potvrzeno také studií Zeisinga a kolektivu (*Zeising, B.B, 2004*). Vzhledem ke zjištěnému rozdílu v proliferaci obou kultur bylo dalším krokem porovnání rychlosti jejich odezvy na inhibici. Byla tedy

zjištěna míra výskytu subG1 buněk u obou kultur po 24 hodinové kultivaci pomocí analýzy buněk ovlivněných nejvyšší koncentrací inhibitorů na průtokovém cytometru. Zde se ukázalo, že buňky kultivované v médiu bez 4oht jsou po 24 hodinové kultivaci po inhibici signální dráhy zasaženy výrazně méně, než buňky kultivované v médiu s 4oht.

Je tedy možno konstatovat, že leukemické buňky MEERtm získané z myšího modelu jsou výhodné ve smyslu možnosti získání kontroly pouhou změnou kultivačních podmínek, ovšem je zde viditelná limitace v podobě určité závislosti buněk na dodávce 4- hydroxytamoxifenu. Pokud tuto složku v kultivačním médiu nemají, je ovlivněna nejen jejich schopnost proliferovat a také jejich celková viabilita.

Dále byly testovány buněčné linie CEM a K562 odvozené z lidských leukemických buněk. Tyto linie byly vybrány cíleně dle seznamu NCI-60, který je sestaven z buněčných linií využívaných pro biologické testování. Výsledky testování zde potvrdily vysokou citlivost buněk na inhibici signální dráhy ATR-Chk1, taktéž byly buňky velice citlivé na použití kombinace Chk1i/Mk2i, kde Mk2 poskytl pouze aditivní účinek k Chk1i a sám o sobě neprokázal velkou účinnost.

U těchto linií bylo nutné zajistit kontrolu nenádorové buněčné linie, která by umožnila srovnání účinku inhibice na buňky leukemické a buňky reprezentující zdravou tkáň. Byly vyzkoušeny několikere možnosti, mezi něž patřily buňky kostní dřeně a lymfocyty periferní krve jako reprezenanti standardní hematopoetické tkáně, ovšem žádná z nich se neukázala být kontrolou vhodnou k testovaným buněčným liniím. Dále byla vyzkoušena buněčná linie LBL, což je uměle immortalizovaná buněčná linie, která se taktéž ukázala být jako kontrola nevhodná. V konečné fázi byly jako kontrola použity buněčné linie MRC-5 a BJ jako reprezentanti nenádorové tkáně. U těchto buněk je již možno pozorovat signifikantní rozdíl mezi nimi a nádorovými buněčnými liniemi CEM a K562, kdy ani nejvyšší koncentrace, která u leukemických buněk snižovala viabilitu téměř na hodnoty blízké se nule, u kontrolních linií neměla výraznější efekt.

Porovnání účinků samotného inhibitoru Chk1i a kombinace inhibitorů Chk1i/Mk2i přineslo poznatek, že leukemické linie použité při těchto experimentech nepatří mezi ty buněčné linie, u nichž se účinek inhibice signálních drah pomocí kombinace inhibitorů násobí v porovnání s účinky samotného Chk1i.

7 Závěr

Inhibice drah odpovědi buněk na poškození DNA má dle výsledků získaných v experimentální části této práce výrazný vliv na viabilitu nádorových buněk. U MEERtm +/- 4oht je pozorovatelný rozdíl v procentuálním zastoupení subG1 buněk mezi kontrolou (DMSO) a buňkami ovlivněnými Chk1i a kombinací Chk1i/Mk2i po 24 kultivaci přibližně 30 %. Při srovnání CEM a K562 s BJ a MRC-5 se rozdíl ve viabilitě v případě buněk ovlivněných inhibitorem Chk1 a kombinací Chk1i/Mk2i pohyboval okolo 80 %. Z výsledků je také možno vyvodit závěr, že u kombinace Chk1i a Mk2i aplikované na leukemické buňky je většina efektu této kombinace zapříčiněna Chk1i inhibitorem a Mk2i zde má spíše aditivní efekt k účinnosti inhibice. Celkově je možno říci, že strategie inhibice drah odpovědi buněk na replikační stres je slibnou oblastí ve výzkumu zabývajícíím se vývojem nových léčebných metod leukemických onemocnění

8 Seznam zkratek

4-oht - 4-hydroxytamoxifen

52BP1 - p53 binding protein 1 - p52 vazebný protein 1

AAF - N-acetoxy-2-aminofluoren

APC - Antigen presenting cells

APE1 - Apurinic/aprimidinic endonuclease 1

ATM - Ataxia telangiectasia mutated

ATR - ATM and Rad3 related

BER - Base excision repair - bázová excizní oprava

BPDE - benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid

BRCA1/2 - Breast cancer 1/2

CDC25/B - Cell division cycle 25/B

CDK - Cyklin dependentní kináza

DAPMs - Danger associated molecular patterns

DDR - DNA damage response - odpověď na poškození DNA

DDT - DNA damage tolerance - dráhy tolerance poškození DNA

DMSO - dimethylsulfoxid

DNAM1 - DNAX accessory molecule-1

DNA-PKcs - DNA dependentní protein kináza

DSBs - Double strand breaks - dvouvláknové zlomy

dsDNA - dvouvláknová DNA

ERCC1/4-XPF- ERCC excision repair 1, xenoderma pigmentosum factor

EXO1 - Exonuclease 1 - exonukleáza 1

FBS - bovinní fetální sérum

GM-CSF - Granulocyte macrophage colony stimulating factor

HR - Homologní rekombinace

Chk1 - Checkpoint kinase 1 - kináza kontrolního bodu 1

Chk1i - Checkpoint kinase 1 inhibitor - inhibitor kinázy kontrolního bodu 1

Chk2 - Checkpoint kinase 2 - kináza kontrolního bodu 2

IL-3/6/8 - interleukin 3/6/8

MEERTm - MII-ENL-Ertm

MHC1 - hlavní histokompatibilní proces 1

Mk2/i - mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 /inhibitor

MLH1 - MutL homolog 1

MMEJ - Microhomology - mediated end joining - mikrohomologií zprostředkované spojování konců

MRN - MRE11-RAD50-NSB1

MSH2/3/6 - MutS homolog 2/3/6

NAD - nikotinamidadenindinukleotid

NCRs - Natural cytotoxicity receptors

NEAA - non-essential amino acid - neesenciální aminokyseliny

NER - Nucleotide excision repair - Nucleotidová excizní oprava

NHEJ - Non-homologous end joining - spojování nehomologních konců

NK-buňky - Natural killer cells

NUDT5 - Nudix hydrolase 5

PALB2 - Partner and localizer of BRCA2

PARPs - Poly(ADP-ribóza)polymerázy

PCNA - proliferating cell nuclear antigen -proliferační jaderný antigen

PINK1 - PTEN-induced putative kinase 1

POLB - DNA polymerase beta

POT1 - Protection of telomeres 1

PRRs - Pattern recognition receptors

ROS - Reactive oxygen species - reaktivní kyslíkové radikály

RPA - Replikační protein A

RPMI medium - Roswell park memorial institute medium

SASP - senescence-associated secretory phenotype

SCF - stem cell factor

SSBs - Single strand break(s) - jednovláknové zlomy

ssDNA - jednovláknová DNA

TAO kinases -Thousand and one amino acid kinases

TERF1/2 - Telomer repetition factor 1/2

TINF2 - Telomer interacting factor 2

TRF1/2 - Teromeric repeat binding factor 1/2

XRCC1/4 - X-ray repair cross-completing protein 1/4

9 Literatura

Ahmed, M., Li, K., Pinnix, Ch., Dabaja, B., Nomie, K. (2016): ATM mutation and radiosensitivity: An opportunity in the therapy of mantle cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 107, 14 – 19

Aravinthan, A. (2015): Cellular senescence: a hitchhike's guide. *Human cell* 28, 51 - 64

Artandi, S.E., DePintho, R.A. (2010): Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 31, 9 - 18.

Bartek, J., Mistrik, M., Bartkova, J. (2012): Thresholds of replication stress signaling in cancer development and treatment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 5 - 7.

Bassing, C.H., Alt, F.W. (2004): The cellular response to general and programmed DNA double-strand breaks. *DNA Repair* 3, 781 - 796.

Benada, J., Macurek, L. (2015): Targeting the Checkpoint to Kill Cancer Cells. *Biomolecules* 5, 1912- 1937.

Candeias, S.M., Testard, I. (2015): The many interactions between the innate immune system and the response to radiation. *Cancer Lett.* 368, 172 - 178.

Dietlein, F., Kalb, B., Jokic, M., Elisa, M.N., Strong, A., Bartkova, J., Bartek, J. (2015): A Synergistic Interaction between Chk1- and Mki2 Inhibitors in KRAS-Mutant Cancer. *Cell*, 162, 146 - 159.

Farmer, H., et al (2005): Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917 - 921.

Friedberg, E.C., Walker, G.C, Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., Ellenberger, T. (2006): *DNA repair and mutagenesis* (2nd ed.). ASM Press. ISBN 978-1-55581-319-2.

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

Henle, E.S., Linn, S., (1997): Formation, prevention and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 272, 19095 – 19098.

Hornsby, P.J. (2003): Mouse and human cells versus oxygen. *Sci.Aging Knowledge Environ* 21.

Huarte, M. (2016): p53 partners with RNA in the DNA damage response. *Nat. Genet.* 48, 1298 – 1299

Choi, J. H., Klm, S.Y., Klm, S.K., Kemp, M.G., Sancar, A. (2015), An Integrated Approach for Analysis of the DNA Damage Response in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 290, 28812 - 28821

- Jackson, S.P., Bartek, J. (2009): The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071 - 1078.
- Johnson. N. et al. (2011): Compromised CDK1 activity sensitizes BRCA-proficient cancers to PARP inhibition. *Nature Med.* 17, 875 - 882.
- Kuwano, Y., Nishida, K., Akaike, Y., Kurokawa, K., Nishikawa, T. (2016): Homeodomain-Interacting Protein Kinase-2: A critical Regulator of the DNA Damage Response and the Epigenome. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 135 – 148.
- Lieber, M.R. (2010): NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations. *Nature Struct. Mol. Biol.* 17, 393 - 395.
- Lindahl, T. (1993): Instability and decay of primary structure of DNA. *Nature (London)* 362, 709 - 715.
- Lopez-Soto, A., Huergo-Zapico, L., Acebes-Huerta, A., Villa-Alvarez, M., Gonzalez,S. (2015): NKG2D signaling in cancer immunosurveillance. *Int. J. Cancer* 136, 1741 - 1750.
- Lord, Ch.J., Ashworth, A. (2012): The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481, 287 - 294.
- Manic, G., Obrist, F., Sistigu, A., Vitale, I. (2015): Trial Watch: Targeting ATM-CHK2 and ATR-CHK1 pathways for anticancer therapy. *Mol. Cell. Oncol* 4
- Marino, G., Ugalde, A.P., Fernandez, A.F., Osorio, F.G., Fueyo, A., Freije, J.M., Lopez-Otin, C. (2010): Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 16268 - 16273.
- Mercer, J., Mahmoudi, M., Bennet, M. (2007): DNA damage, p53, apoptosis and vascular disease. *Mutat. Res.* 621, 75 - 86.
- Min Kim, K., Jae Moon, Y., Park, S.H., Park, H.J., Sung, I.W., Park, H.S., Lee, H., Kwon, K.S., Moon, W.S., Lee, D.G., Kim, J.R., Jang, K.Y. (2016): Individual and Combined Expression of DNA Damage Response Molecules PARP1, γH2AX, BRCA1, and BRCA2 Predict Shorter Survival of Soft Tissue Sarcoma Patients. *Plos One* 9.
- Moureau, S., Luessing, J., Harte, E.Ch., Viosin, M., Lowndes, N.F. (2016): A role for the p53 tumor suppressor in regulating the balance between homologous recombination and non-homologous end joining. *Open Biol.* 6
- Moynaha, M.E., Jasin, M. (Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nature. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 196 - 207.
- Pommier, Y., Leo. E., Zhang, H., Marchand, C. (2010): DNA topoisomerase and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem. Biol.* 17, 421 - 433.

- Poole, A., Penny, D., Sjöberg, B.M. (2001): Confused cytosine! Tinkering and the evolution of DNA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 147 – 151.
- Proteggente, A.R., Rechman, A., Halliwell, B, Rice-Evans, C. A. (2000): Potential problems of ascorbate and iron supplementation: pro-oxidant effect *in vivo*? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277, 535 - 540.
- Raman, M., Earnest, S., Zhang, K., Zhao, Y., Cobb, M.H. (2007): TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage. *EMBO J* 26, 2005 – 2014.
- Rass, U., Ahel, I., West, S.C. (2007): Defective DNA repair and neurodegenerative disease. *Cell* 130, 991 - 1004.
- Riley, P.A. (1994): Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 62, 27 - 33.
- Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M.J., Kaufmann, S.H., Poirier, G.G. (2010): PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nature Rev. Cancer* 10, 293 - 301.
- Shiloh, Y. (2003): ATM related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Rev. Cancer* 3, 155 - 168.
- Soria-Valles, C., López-Soto, A., Osorio, F.G., López-Otín, C. (2016): Immune and inflammatory responses to DNA damage in cancer and aging. *Mech. Aging Dev.*, doi.org/10.1016/j.mad.2016.10.004
- Strand, J.M., Scheffler, K., Bjørås, Eide, L. (2014): The distribution of DNA damage is defined by region-specific susceptibility to DNA damage formation rather than repair differences. *DNA Repair* 18, 44 – 51.
- Takacova, S., Slany, R., Bartkova, J., Stranecky, V., Dolezel, P., Luzna, P., Bartek, J., Divoky, V. (2012): DNA Damage Response and Inflammatory Signaling Limit the MLL-ENL-Induced Leukemogenesis In Vivo. *Cancer Cell* 21, 517 – 521.
- Warmerdam, D.O., Kanaar, R. (2010): Dealing with DNA damage: relationships between checkpoint and repair pathways. *Mutat. Res.* 704, 2 - 11.
- Zeisig, B.B., Milne, T., García-Cuellar, M-P., Schreiner, S., Martin, M.E., Fuchs, U., Borkhardt, A., Chanda, S.K., Walker, J., Soden, R., Hess, J.L., Slany, R.K. (2004): Hoxa9 and Meis1 Are Key Targets for MLL-ENL-Mediated Cellular Immortalization. *Mol. Cell. Biol.* 24, 617 - 627.
- Zeman, M.K., Cimprich, K.A. (2014): Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* 16, 2 - 9.