

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2018

Tereza Buchtová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Odpověď na poškození DNA v BRCA1
deficientních buněčných liniích**

Diplomová práce

Tereza Buchtová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: Mgr. Dušana Majera, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením Mgr. Dušany Majery, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci

.....

Tereza Buchtová

Souhrn

Odpořď na poškození DNA v BRCA1 deficientních buněčných liniích

BRCA1 je gen kódující lidský nádorový supresorový protein stejného jména, který hraje důležitou roli při udržování genomové stability. To zahrnuje aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu v odpovědi na poškození DNA a také samotnou opravu poškozené DNA. Některé zárodečné mutace v *BRCA1* genu vedou u postižených jedinců k významné predispozici k malignitám, jakou jsou rakovina prsu a vaječníků.

Cílem této diplomové práce bylo studium haploinsuficience *BRCA1* v unikátním buněčném modelu v podobě primárních porcinních fibroblastů. Jedná se o buněčné linie s konstitucí alel *BRCA1* +/- a k nim kontrolní *BRCA1* +/+, jež byly získány z nedávno vytvořeného GMO prasete. Prase je vhodným modelovým organismem pro lékařský výzkum, a to díky jeho relativní fyziologické podobnosti člověku. Na rozdíl od myších modelů je však tvorba GMO prasat velmi náročná a teprve až s moderními systémy genových „knock-inů“ a „knock-outů“ je lze využít i pro výzkum specifických lidských nemocí jako je rakovina.

U testovaných buněčných modelů byla nejprve optimalizována detekce a následně i srovnána míra exprese *BRCA1* proteinu metodou *western blotting*. Linie byly dále testovány na citlivost vůči inhibitoru PARP1 enzymu, který patří mezi současné nejnadějnější léčiva ženských malignit. Inhibitory PARP1 se v terapii rakoviny ukazují jako obzvláště účinné v případech deficitu *BRCA1* proteinu, kdy inhibice PARP1 enzymatické aktivity vede u postižených buněk k akumulaci toxického DNA poškození v podobě dvouvláknových DNA zlomů. Testy toxicity byly prováděny pomocí kolorimetrické metody využívající druhou generaci tetrazoliových solí jejichž redukcí vzniká barevný formazan v důsledku metabolické aktivity buněk (tzv. XTT test).

Dále byla u modelu pomocí kvantitativní imunofluorescenční mikroskopie analyzována efektivita opravy dvouvláknových zlomů DNA. Výběrem vhodných protilátek byla analyzována oprava DNA zlomů jak pomocí homologní rekombinace, tak i nehomologního spojování volných DNA konců. Rovněž byla analyzována odpověď na replikační stres vedoucí k zastavení a kolapsu replikačních vidlic.

Protein *BRCA1* byl úspěšně detekován ve všech testovaných liniích s nejsilnější expresí v linii 539 (+/+). Po podání inhibitoru PARP1 byla zaznamenána vyšší citlivost haploinsuficientních linií. V případě efektivy oprav DNA lézí se podařilo optimalizovat a následně i kvantifikovat několik vhodných proteinových markerů, nicméně po ozáření buněk gama zářením se odpověď haploinsuficientních linií nelišila od kontrol. Také po expozici replikačnímu stresu nebyla u zkoumaných linií pozorována zásadně rozdílná akumulace defektní jedno-řetězcové DNA.

Klíčová slova: BRCA1; rakovina; haploinsuficience; odpověď na poškození DNA; dvouvláknové DNA zlomy; mutace; porcinní model

Summary

DNA damage responses in BRCA1 deficient cell lines

BRCA1 is a human tumour suppressor gene which product plays important role in maintaining of genomic stability. That includes DNA-damage-induced cell cycle checkpoint activation and DNA damage repair. Some of the germline mutation in BRCA1 gene predispose mainly to breast and ovarian cancer.

The aim of this diploma thesis was to study an impact of haploinsufficiency of BRCA1 gene in a unique cellular model involving primary porcine fibroblasts. The used BRCA1 +/- and BRCA1 +/+ cell lines were derived from a recently developed GMO animals. The pig is an excellent model organism for medical research because of its physiological similarity with humans but instead of mouse models the GMO pig introduces much bigger technological challenge. The advanced technological solutions of knock-ins and knock-outs finally allow construction of cancer-relevant models.

In the primary porcine fibroblasts, the BRCA1 protein detection was optimised and compared between cell lines using western blot method. Cell lines were also tested for their sensitivity towards the PARP1 enzyme inhibitor, which belongs to the most promising treatments strategies of the woman malignancies currently available. Inhibitors of PARP1 seems to particularly effective in BRCA1 deficient backgrounds which fact is explained as accumulation of toxic double-stranded DNA lesions caused by PARP1 enzyme blockade which repair is vastly dependent on BRCA1 protein. The sensitivity of the cell lines was analysed calorimetrically using the second generation of tetrasolium salts which are reduced to coloured formazan in the presence of metabolically active cells (XTT test).

Next, the DNA lesions repair efficacy was analysed in the cell lines using quantitative immunofluorescence microscopy. The ability of cells to repair DNA lesions either by homologous recombination or by non-homologous enjoining explored in details. Cells were also flowed under the replication stress conditions which are causing stalling and collapses of replication forks and accumulation of single stranded DNA.

The BRCA1 protein was successfully detected in all tested porcine fibroblasts with the strongest expression in 539 (+/+) cell line. After the treatment with PARP1 inhibitor the haploinsufficient cell lines display higher sensitivity. In case of the repair efficacy of DNA lesions few antibodies were optimized against proper DNA lesion markers but the quantification of gamma irradiation induced DNA damage did not reveal any differences between the tested cell lines. Also the exposition of cells towards replication stress displayed constant increase in the amount of defective single stranded DNA throughout the all tested cell lines.

Key words: BRCA1; cancer; haploinsufficiency; DNA damage response; double-strand-breaks (DSBs); mutations; porcine model

Poděkování

Mé poděkování patří Mgr. Dušaně Majeře, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, ochotu a cenné rady, které mi v průběhu magisterského studia věnovala. Děkuji také ostatním kolegům z laboratoře Integrity Genomu na Ústavu molekulární a translační medicíny za vřelé přijetí a pomoc, kterou mi poskytli.

Tento projekt byl podpořen IGA grantem: IGA_LF_2017_002.

Obsah

1	Seznam zkratek	ix
2	Seznam obrázků	xi
3	Seznam tabulek	xi
4	Seznam grafů.....	xi
5	Úvod.....	1
6	Cíle práce	3
7	Struktura a funkce BRCA1	4
8	Haploinsuficience BRCA1	6
8.1	Buněčná senescence indukovaná haploinsuficiencí BRCA1	7
9	Buněčný cyklus	8
10	Kontrolní body	10
11	Odpověď na poškození DNA.....	11
11.1	Homologní rekombinace.....	13
11.2	Nehomologní spojování volných DNA konců.....	14
11.3	Oprava zastavené replikační vidlice	18
12	Terapeutický potenciál PARP inhibitorů a dalších léčiv u BRCA1 deficientních nádorů	20
13	Rakovina, její vznik a rozvoj	22
14	Materiál a metody	26
14.1	Biologický materiál.....	26
14.2	Použité chemikálie a soupravy.....	27
14.3	Použité roztoky	29
14.4	Přístroje.....	29
14.5	Metody	30
14.5.1	Pasážování buněk	30
14.5.2	Rozmrazování buněk.....	30
14.5.3	Zamrazování buněk	31
14.5.4	Western blotting	31
14.5.5	XTT	32
14.5.6	Imunofluorescenční analýza	32
14.5.7	Population dubling.....	33
15	Výsledky	34
15.1	Ověření přítomnosti BRCA1 a její semikvantitativní srovnání mezi liniemi	34
15.2	Srovnání senzitivity buněčných linií na PARP-1 inhibitor KU-0058948.....	35
15.3	Porovnání odpovědi buněčných linií HR na poškození DNA	37
15.4	Porovnání odpovědi buněčných linií na poškození DNA mechanismem NHEJ	39
15.5	Porovnání odpovědi buněčných linií na zastavenou replikační vidlici	42

16	Diskuse.....	45
17	Závěr	48
18	Literatura.....	49

1 Seznam zkratek

53BP1 p53-binding protein	DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole
Aj. a jiné	DEAH Asp-Glu-Ala-His
A-NHEJ <i>alternative non-homologous end-joining</i>	DMEM <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
Anti-CTLA4 mAb <i>anti-Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen monoclonal antibody</i>	DNA <i>deoxyribonucleic acid</i>
APC/C <i>anaphase-promoting complex</i>	DNA2 <i>DNA replication helicase/nuclease 2</i>
Aph <i>aphidicolin</i>	DNA-PKcs <i>DNA-dependent protein kinases</i>
APS <i>ammonium persulfate</i>	DSBs <i>double strand breaks</i>
APLF <i>aprataxin and PNK-like factor</i>	DTT <i>dithiothreitol</i>
APTX <i>Aprataxin</i>	DUB <i>deubiquitinating enzyme</i>
Atd. a tak dále	E2 <i>ubiquitin-conjugating enzyme</i>
ATM <i>ataxia telangiectasia mutated kinase</i>	E2F <i>DNA-binding transcription factor</i>
ATP <i>adenosine triphosphate</i>	E3 <i>ubiquitin ligase</i>
ATR <i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>	EGFR <i>epidermal growth factor receptor</i>
BACH1 <i>BRCA1-associated C-terminal helicase</i>	EXO1 <i>exonuclease 1</i>
BARD1 <i>BRCA1-associated ring domain 1</i>	FA <i>Fanconi anemia</i>
Bak <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>	FAN1 <i>Fanconi-associated nuclease 1</i>
Bax <i>BCL2 associated X</i>	FANCC <i>Fanconi anemia group C protein</i>
BCA <i>bicinchoninic acid assay</i>	FANCI <i>Fanconi anemia group I protein</i>
Bcl-2 <i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	FANCD2 <i>Fanconi anemia group D2 protein</i>
BH3 <i>Bcl-2 homology 3</i>	FANCM <i>Fanconi anemia group M protein</i>
BRCA <i>breast cancer susceptibility gene</i>	FBS <i>fetal bovin serum</i>
BRCT <i>BRCA1 C Terminus</i>	FHA <i>forkhead associated domain</i>
BRIP1 <i>BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1</i>	FICT <i>fluorescein isothiocyanate</i>
CCDC98 <i>coiled-coil domain-containing protein</i>	G fáze <i>gap fáze</i>
Cdc <i>cell division control protein</i>	GTP <i>guanosine triphosphate</i>
CDKs <i>cyclin-dependent kinases</i>	HERC2 <i>HECT domain and RCC1-like domain-containing protein 2</i>
CHD1L <i>chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1-like</i>	HGF <i>c-Met hepacocyte growth factor receptor</i>
CKIs <i>CDKs inhibitors</i>	HJ <i>Holiday junction</i>
Chk <i>checkpoint kinase</i>	HR <i>homologous recombination</i>
C-NHEJ <i>classical non-homologous end-joining</i>	ITR <i>inverted terminal repeat</i>
CRL3 <i>Cullin 3-RING ubiquitin ligase</i>	LHA <i>left homologous arm</i>
CtBP <i>C-terminal-binding protein 1</i>	LSB <i>Laemmli sample buffer</i>
CtIP <i>CtBP-interacting protein</i>	MAP <i>mitogen activated protein</i>
Ctl <i>control</i>	MDC1 <i>mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
	MDR <i>multiple drug resistance</i>
	M fáze <i>mitotická fáze</i>

MRE11 *meiotic recombination 11 homolog*
MRN *Mre11-RAD50-NBS1*
např. například
NBN *nibrin*
NBS1 *nibrin*
Neo *neomycin*
NHEJ *non-homologous end-joining*
NLS *nuclear localization signal*
Nrf-2 *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
Ox oxidující skupina
P fosfátová skupina
p.a. pro analýzu
PALB2 *Partner and localizer of BRCA2*
PARP1 *Poly(ADP-ribose)polymerase 1*
PARPi *PARP inhibitor*
PAXX *Paralog of XRCC4 and XLF*
PBS *phosphate-buffered saline*
PCLAF *PCNA clamp associated factor*
Penstrep *penicillin streptomycin*
PIKKs *phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases*
PNKP *Polynucleotide kinase-3'-phosphatase*
POL *polymerase*
PRP19 *pre-mRNA-processing factor 19*
pRPA32 *phospho replication protein A 32 kDa subunit*
PTIP *PAX transcription activation domain interacting protein 1 like*
R *restrictive point*
RAD50/51 *DNA repair protein*
RAP80 *receptor associated protein 80*
Rb *retinoblastoma protein*
Rbl *retinoblastoma like protein*
RECQL *RecQ like helicase*
REV7 *DNA polymerase zeta processive subunit*
RFWD3 *E3 ubiquitin protein ligase*
RHA *right homologous arm*
RIF1 *Rap1-interacting factor 1 homolog*
RNA *ribonucleic acid*
RNF *RING finger protein*
RPA *replication protein A*
RPMI *Roswell Park Memorial Institute medium*
S fáze syntetizační fáze
S *serin*
SCF *Skp1-Cdc53-F-box protein complex*
SDS *sodium dodecyl sulfate*
SENP6 *Sentrin-specific protease 6*
siRNA *small interfering RNA*
SIRT1 *Sirtuin 1*
SLX4 *structure-specific endonuclease subunit*
SMARCAL1 *SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1*
SSBs *single strand breaks*
ssDNA *single-stranded DNA*
SUMO *small ubiquitin-like modifier*
TEMED *tetramethylethylenediamine*
TOPBP1 *Topoisomerase II β -Binding protein 1*
tzv. takzvaný
Ubc13 *ubiquitin conjugating protein enzyme E2 13*
UBE2D *UbcH5 ubiquitin-conjugating enzyme*
UMTM *Ústav molekulární a translační medicíny*
USP11 *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 11*
UV *ultraviolet*
VEGF *vascular endothelial growth factor*
WRN *Werner syndrome ATP-dependent helicase*
XLF *XRCC4-like factor*
XRCC4 *X-ray repair cross-complementing protein 4*
Zeo *zeocin*

2 Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura BRCA1 proteinu (převzato a upraveno dle Roy et al., 2012)

Obrázek 2: Základní regulace buněčného cyklu (převzato a upraveno dle Chiu a Dawes, 2012)

Obrázek 3: Systémová odpověď na poškození DNA (převzato a upraveno dle Nielsen et al., 2016)

Obrázek 4: Mechanismy opravy aNHEJ (převzato a upraveno dle Lazzerini-Denchi a Sfeir, 2016)

Obrázek 5: Mechanismy oprav cNHEJ a HR (převzato a upraveno dle Schwertman et al., 2016)

Obrázek 6: Odpověď buňky na zastavenou replikační vidlici (převzato a upraveno dle Nielsen et al., 2016)

Obrázek 7: Princip syntetické letality u BRCA1 deficientních buněk vystavených PARP1 inhibitoru (převzato a upraveno dle Iglehart a Silver, 2009)

Obrázek 8: Charakteristické znaky rakoviny a možnosti jejich terapeutického zacílení (převzato a upraveno dle Hanahan a Weinberg, 2011)

Obrázek 9: Schéma genového lokusu na BRCA1 a vložené transgenní kazety (převzato a upraveno dle Luo et al., 2011)

Obrázek 10: Detekované proteiny BRCA1 a β -aktinu metodou *western blotting*

Obrázek 11: Fotografie z fluorescenčního mikroskopu znázorňující odpověď RAD51 na poškození DNA a jeho kolokalizaci s cyklinem A

Obrázek 12: Fotografie z fluorescenčního mikroskopu znázorňující odpovědi γ H2AX s 53BP1 na poškození DNA

Obrázek 13: Fotografie z fluorescenčního mikroskopu znázorňující odpovědi RPA a pRPA na zastavenou replikační vidlici

3 Seznam tabulek

Tabulka 1: Seznam použitých buněčných linií primárních porcinních fibroblastů

Tabulka 2: Seznam použitých protilátek

4 Seznam grafů

Graf 1: Výsledek XTT s koncentrační řadou PARP1 inhibitoru KU-0058948

Graf 2: Doba, za kterou se v kultuře zdvojí populace buněk

Graf 3: Výsledek imunofluorescenční analýzy odpovědi 53BP1 (A) a γ H2AX (B) na poškození DNA během nehomologního spojení konců

Graf 4: Výsledek imunofluorescenční analýzy odpovědi pRPA32 na zastavenou replikační vidlici během replikace DNA

5 Úvod

Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) je tumor supresorový protein, který se zúčastňuje mnoha buněčných drah, které udržují genomovou stabilitu. Ta zahrnuje odpověď na poškození DNA a aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu – tzv. checkpointů. Má rovněž homeostatickou funkci, která však není nutně spojena s poškozením DNA, viz kapitola Struktura a funkce BRCA1 (Wu et al., 2010; Pathania et al., 2014). Mutace BRCA1 genu v zárodečné linii vede k predispozici pro rakovinu prsu a vaječníků (Futreal et al., 1994). Vznik tumoru je zde přímo asociován se ztrátou či potlačením exprese jedné alely, což je zároveň i důkaz tumor supresivní funkce BRCA1 (Neuhausen a Marshall, 1994). Mutace v jedné alele zpravidla způsobuje významné snížení produkce celkového proteinu (tzv. haploinsuficience) (Pathania et al., 2014).

Ve většině případů mutované alely tumor-supresorového genu BRCA1, následuje během tumorogeneze mutace nebo ztráta i druhé, zdravé alely. Mutování tohoto genu se tak řídí Knudsenovým "*two hits*" modelem (Merajver et al., 1995; Rosen, 2013). "*Two hits*" model Knudsen definoval již v roce 1971 u tumor-supresorového genu kódující *retinoblastoma protein* (RB) v buňkách retiny oka. Mutace se tak jeví jako autosomálně dominantní, ale dědí se recesivně (Rosen, 2013). Knudsenův "*two hits*" model je typický pro lidské a také porcinní buňky, nikoliv však pro myši, což je důvodem, proč není myš vhodným modelovým organismem pro studium rakoviny asociované s mutovanou *BRCA1* (Luo et al., 2011).

Úplná ztráta BRCA1 má za následek významnou genomovou nestabilitu, která za normálních podmínek vede až k zastavení proliferace postižených buněk. Pro další fázi onkogenní transformace tak buňka nutně musí prodělat další mutaci či mutace. Velmi běžná je například současná mutace v tumor-supresorovém genu kódujícím p53 protein (případně p21), ta však pro pokračování buněčného růstu není dostatečná (Hakem et al., 1997). V případě genu pro 53BP1 protein je jeho mutace pro překonání ochranných mechanismů buňky zpravidla dostačující (Cao et al., 2009).

Tato diplomová práce je zaměřená na vybrané analýzy v primárních porcinních fibroblastech zahrnující analýzu odpovědi těchto buněk na DNA poškození a také jejich citlivost na inhibici PARP-1 enzymu. Prase je velmi dobrým modelovým organismem pro lidský medicínský výzkum, protože jeho genom, vývoj a velikost orgánů, metabolismus, fyziologie a délka života jsou výrazně podobnější člověku oproti jiným běžně využívaným laboratorním zvířatům (Wernersson et al., 2005; Luo et al., 2011). V této práci je navíc použit unikátní buněčný model derivovaný z nedávno dokončeného GMO prasete s vnesenou zárodečnou mutací do jedné z alel BRCA1 genu (Luo et al., 2011). Nakolik je tento BRCA1 haploinsuficientní GMO organismus vhodným modelem pro spontánní vznik nádorů prsu a/nebo vaječníků ještě není známo z důvodu velkých časových nároků na takovou analýzu. Nicméně buňky těchto prasat je již možné zkoumat ať už z důvodu optimalizace případných molekulárně biologických technik, tak i z hlediska podobnosti s buňkami lidskými.

6 Cíle práce

Hlavním cílem této práce je analýza haploinsuficence proteinu BRCA1 při odpovědi buňky na poškození DNA. Pro tento záměr budou testovány linie primárních porcinních fibroblastů s +/- konstitucí alel *BRCA1*, které budou srovnávány s kontrolními liniemi (+/+). Pro analýzu buněčné odpovědi bude zvoleno několik proteinů zapojujících se do rozpoznání a opravy poškozené DNA. Zvláštní zřetel bude brán na opravu DNA mechanismy homologní rekombinace a nehomologního spojování volných DNA konců. Rovněž bude na těchto liniích analyzován vliv replikačního stresu, který interferuje s integritou replikačních vidlic, jejichž stabilizace i oprava závisí do značné míry na BRCA1 proteinu. Práce si také klade za cíl na těchto liniích otestovat citlivost vůči inhibitoru PARP-1 enzymu.

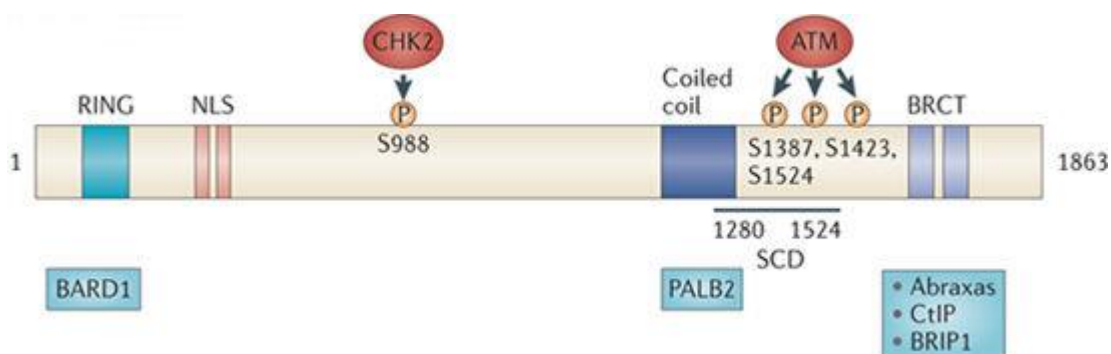
7 Struktura a funkce BRCA1

BRCA1 je tumorový supresor zapojující se do oprav DNA, do regulace kontrolních bodů buněčného cyklu a do řady dalších procesů spojených s udržováním genomové integrity. Mutace v jedné alele BRCA1 není letální, nicméně u postižených lidských jedinců je zpravidla následována mutací a ztrátou i druhé alely, která významně zvyšuje vznik rakoviny prsu, vaječníku, aj. (Wu et al., 2010; Rosen, 2013; Pathania et al., 2014).

Gen *BRCA1* sestává z 24 exonů, z toho je 22 kódujících s jedenáctým největším exonem, kódujícím 60 % celého proteinu (Miki et al., 1994; Wu et al., 2010; Rosen, 2013). Lidská *BRCA1* se nachází na pozici 17q21.33. Porcinní *BRCA1* se nachází na zcela jiném chromozómu (na 12. chromozómu). Pozice genu ale nijak neovlivňuje jejich identičnost aminokyselinové sekvence, která činí 74 %, na rozdíl od myši, kde je shoda pouhých 58 % (Luo et al., 2011).

Lidská i porcinní BRCA1 se skládá z 1863 aminokyselin. Molekulární hmotnost proteinu BRCA1 dosahuje 220 kDa, přičemž nejeví strukturální homologii k jiným proteinům lidského těla, s výjimkou C a N terminálního konce. N terminální RING doména se váže s kruhovou doménou BARD1. Tento heterodimer se vyznačuje E3 ubikvitin-ligázovou aktivitou (Wu et al., 1996; Xia et al., 2003; Panier and Durocher, 2009; Rosen, 2013). C terminální BRCT je fosfoproteinová vazebná doména navazující se na motivy s fosfoseriny nebo fosfotyrosiny (Manke et al., 2003). BRCT doména slouží k translokaci a akumulaci BRCA1 proteinu do místa poškození deoxyribonukleové kyseliny DNA (Au a Handerson, 2005; Wu et al., 2010). Obě tyto domény jsou důležité pro protirakovinnou funkci BRCA1 (Monteiro et al., 1996; Williams and Glover, 2003).

BRCA1 dále obsahuje jaderný importní a exportní signál a je možné ji na různých pozicích fosforylovat, a to pomocí kináz Chk2, ATM a ATR, díky čemuž může formovat různé komplexy do místa poškození DNA, viz obr. 1 ((Rodríguez and Henderson, 2000; Rosen, 2013).



Obrázek 1: Struktura BRCA1 proteinu (převzato a upraveno dle Roy et al., 2012)

Legenda: NLS *nuclear localization sequence*; SCD *SQ/TQ cluster domain*

BRCA1 protein je preferenčně exprimovaný během S a G2 fáze buněčného cyklu a zpravidla se koncentruje do jaderných fokusů (Scully et al., 1996 a 1997a). BRCA1 udržuje genomovou integritu způsobem spojeným s opravou DNA a s kontrolními body buněčného cyklu, dále má i homeostatickou funkci, která s poškozením DNA nutně nesouvisí (Pathania et al., 2014).

BRCA1 ve vazbě s proteinem PCLAF je důležitá pro udržování počtu centrozomů (Kais et al., 2011). Dále je buňkou využívaná formou heterodimeru s BARD1 pro formaci dělicího vřeténka, pro přesun z mitózy do G1 fáze, pro segregaci chromozomů a opětnou tvorbu jádra (Joukov et al., 2006). Také se zapojuje do správného vývoje savců regulací řídicího genu *Slug*. Tento transkripční supresor je deregulován i u jedinců s haploinsuficiencí *BRCA1* (Proia et al., 2011).

Slug protein patří do tzv. Snail rodiny a reguluje transkripci spouštěním epiteliální-mezenchymální tranzice během embryonálního vývoje a také tumorové progresi. Reguluje například E-Cadherin, patřící mezi tzv. *junction proteins* (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Niessen et al., 2008).

BRCA1 je nezbytný pro integritu konstitutivního heterochromatinu. Jeho ztrátou se narušuje genové umlčování v tandemově se opakujících DNA oblastech, které je způsobeno absencí monoubiquitinace histonu H2A komplexem BRCA1-BARD1. Narušení monoubiquitinace vede ke genomové nestabilitě (Xia et al., 2003; Zhu et al., 2011, Kalb et al., 2014).

Tumorový supresor BRCA1 dále také kontroluje proteiny, např. Claspin, koaktivátor checkpointové kinázy Chk1 svojí E3 ligázovou aktivitou v heterodimeru s BARD1 (Sato et al., 2012). Může fungovat také jako transkripční koregulátor prostřednictvím navázání na RNA polymerázu II. (Rosen et al., 2006). Rovněž reguluje estrogenový receptor alfa, kdy BRCA1 slouží jako ligand receptoru za blokáce estrogenové signalizace, neboť estrogen mimo jiné funguje jako promotér proliferace buněk (Fan et al., 2001; Liu et al., 2002). Také napomáhá ke stabilitě replikační vidlice, a významně se zapojuje do senescenční odpovědi buňky, která funguje jako tumor-supresorový mechanismus (Campisi, 2005; Pathania et al., 2011; Tu et al., 2011; Tu et al., 2013).

8 Haploinsuficience BRCA1

Haploinsuficience je stav nedostatečnosti produktu daného genu v buňce z důvodu chybějící, expresně inhibované nebo mutované jedné z alel konkrétního genu. Produkt (nejčastěji protein) z jedné alely tak není schopný plně zastoupit funkci produktů z obou alel. Haploinsuficience BRCA1 tak vede například k narušení genomové integrity (Baldeyron et al. 2002; Cousineau a Belmaaza 2007; Pathania et al, 2014).

Z hlediska této diplomové práce je asi nejvíce relevantní publikace Pathania et al. (2014). V ní bylo zvoleno několik buněčných pochodů, na kterých se BRCA1 podílí, a byla otestována haploinsuficience BRCA1 na epiteliálních a fibroblastových lidských buněčných liniích. Pro analýzu byly vybrány následující procesy, do kterých se BRCA1 zapojuje: odpověď na poškození DNA, aktivace kontrolních bodů, udržování počtu centrozomů, formace mitotického vřeténka, regulace *Slug* master genu, a na heterochromatinu založená suprese ribonukleové kyseliny (RNA) (Parvin, 2009; Kais et al., 2011; Proia et al., 2011; Zhu et al., 2011). V práci však nebyla potvrzena abnormalita ve formování mitotického vřeténka, v počtu centrozomů, v represi RNA satelitů, v expresi *Slug* genu, ani v regulaci kontrolních bodů buněčného cyklu v důsledku haploinsuficience. Také na PARP-1 inhibitor buňky odpovídaly se stejnou citlivostí jako kontrolní buňky. Naopak významně odlišná byla odpověď haploinsuficientních buněk na zastavení replikační vidlice, kdy byl pozorován snížený signál pRPA32, který váže jednovláknovou DNA (ssDNA) vznikající při replikačním stresu. Také byl potvrzen zvýšený kolaps samotných replikačních vidlic. Dále se ukázáno, že po replikačním stresu je zasazen i proces homologní rekombinace (HR), podílející se na opravě a restartu zablokovaných replikačních vidlic. To se projevilo například poklesem signálu rekombinázy RAD51. Schopnost vazby RAD51 do jiných typů DNA lézí však zůstala neporušena. Také při souběžné expozici replikačnímu stresu a PARP-1 inhibitoru olaparibu vykazovaly haploinsuficientní buňky větší citlivost.

Některé dřívější výzkumy však ukazují i jiné výsledky. Například dle publikací skupin Cousineau a Belmaaza (2007) a Konishi et al. (2011) jsou BRCA1 haploinsuficientní buněčné linie defektní v HR obecně, tedy včetně oprav DNA zlomů a jsou i celkově citlivější na genotoxický stres. Skupina Baldeyron et al. (2002) dokonce ukazuje u haploinsuficientních BRCA1 buněk také defekt v DNA opravě mechanismem nehomologního spojování DNA konců (NHEJ).

Odlišné výsledky je možné vysvětlit různými použitými metodami, použitými buněčnými liniemi, vlivem buněčného cyklu, který není v uvedených pracích vždy náležitě adresován (Merel et al., 2002; Bau et al., 2006).

8.1 Buněčná senescence indukovaná haploinsuficiencí BRCA1

Data o dopadu haploinsuficience BRCA1 byla doplněna publikací od Sedic et al. (2015). Autoři zjistili, že BRCA1 deficientní (+/-) lidské prsní epiteliální buňky vykazují zvýšenou odpověď na poškození DNA, telomerovou disfunkci a celkovou genomovou nestabilitu. To se projevovalo vyšší přítomností markerů DNA poškození. Výsledkem byla vyšší úroveň fosforylace ATM/ATR checkpointových kináz, fosforylace H2AX (marker DNA lézí) a zvýšený počet 53BP1 fokusů (označující místa dvouřetězcových DNA zlomů).

Tyto buňky dále projevovaly zvýšenou expresi genů spojených s DNA opravou a genů zapojených do aktivace ATR v odpovědi na replikační stres. Akumulovaly se také chromozomální abnormality spojené s telomerovou disfunkcí, což vedlo k různým chromosomálním aberacím jako je spojování telomer a aneuploidii. Významně byla u buněk aktivována i odpověď na poškozenou DNA, která by u normálních buněk zahrnovala aktivaci p53 senescentní odpovědi.

Buněčná senescence je mechanismus suprese celulární proliferace a neoplastické transformace v reakci na stres, telomerovou erozi, onkogenní aktivitu a ztrátu tumorových supresorů. Proces senescence je možné v některých případech zvrátit např. inaktivací p53 dráhy, inaktivací některých interleukinů, deregulací exprese onkogenů a tumorsupresivních proteinů (Kuilman et al., 2010).

Senescence je buněčný program asociovaný s expresí β -galaktosidázy, zastavením v cyklování a morfologickými a chromatinovými změnami. Běžně je senescence započata p53 a p16^{INK4A}-RB (dále také dalšími inhibitory cyklin-dependentních kináz např.: p15^{INK4B}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}) dráhou, kterou je možno použít jako marker senescence spolu s dalšími proteiny jako je p21^{CIP1} a p15^{INK4B} (Kuilman et al., 2010). V případě že se buňka dostane přes bariéru p16^{INK4A}, nastupuje další tzv. agonescence, která je opět indukovaná p53 čistě v reakci na velmi zkrácené telomery a jejich disfunkci (Garbe et al., 2009).

V případě BRCA1 deficientních (+/-) epiteliálních prsních buněk byl kolektivem autorů publikace Sedic et al. (2015) popsán specifický typ senescence, tzv. haploinsuficiencí BRCA1 indukovaná senescence, která, jak se ukázalo, je do značné míry tkáňově specifická. Tým vědců zjistil, že senescenční odpověď je v tomto případě řízena pRB signální dráhou. Tzn., že misregulace SIRT1 (deacetyláza závislá na NAD) v důsledku nedostatečnosti BRCA1 proteinu vede ke zvýšené acetylaci pRB v savčích epiteliálních buňkách, také k akumulaci acetylovaného histonu H4K16, k telomerové erozi a následné genomické nestabilitě. Acetylace pRB pak usnadňuje interakci s proteiny, které se podílejí na diferenciaci a transkripční represi. Prolomení této senescence vede k dodatečné aktivaci p53 a případným dalším genomickým abnormalitám.

9 Buněčný cyklus

Cyklin dependentní kinázy (CDKs) jsou regulovány cykliny. Cykliny jsou syntetizovány a degradovány v daných bodech buněčného cyklu. Pouze několik CDK-cyklin komplexů je přímo zapojeno do regulace buněčného cyklu. Jsou zde tři interfázní CDKs: CDK2, CDK4, CDK6, jeden mitotický CDK1. Tyto CDKs jsou regulovány 10 cykliny ve 4 třídách: A, B, D, E. Tumory jsou velmi často provázeny deregulací CDK-cyklin komplexů, což vede k abnormální proliferaci buněk nebo neplánovanému vstupu do buněčného cyklu (Malumbres a Barbacid, 2005 a 2009).

Na počátku *gap 1* (G1) fáze jsou mitogenní signály nejprve následovány expresí D1, D2 a D3-cyklinů, které se přednostně váží na CDK4 a CDK6 během G1 fáze (Sherr, 1993; Meyerson a Harlow, 1994; Malumbres a Barbacid, 2005). Aktivací komplexů CDK-cyklin se částečně inhibují tzv. *pocket* proteiny: RB, p107, p130, čímž se umožní exprese cyklinů E1 a E2. Tyto cykliny se váží na CDK2 za vzniku aktivního komplexu CDK2-cyklin E (Harbour et al., 1999; Malumbres a Barbacid, 2009). Komplex fosforyluje, a tím inaktivuje zbytek aktivních *pocket* proteinů (Lundberg a Weinberg, 1998; Harbour et al., 1999). CDK2-cyklin E je nezbytný pro přesunutí do S fáze (Hochegger et al., 2008). CDK2 je v pozdní S fázi aktivován cyklinem A2, případně A1 v zárodečných buňkách, pro přesun do *gap 2* (G2) fáze. Na konci interfáze (G2) je aktivován CDK1 jedním z A-cyklinů pro vstup do mitózy. V počátku mitotické (M) fáze jsou A-cykliny degradovány za vzniku komplexů CDK1-cyklin B, které řídí buňku v průběhu mitózy, viz obr. 2 (Malumbres a Barbacid, 2005).

CDK2 a CDK4 a CDK6 i přes zmíněný průběh cyklu nejsou u mnoha buněčných typů esenciální pro regulaci buněčného cyklu. Ztráta každé z CDKs vede k vývojovým defektům u vysoce specializovaných buněk. Pouze ztráta CDK1 vede k zastavení buněčného cyklu (Santamaría et al., 2007).

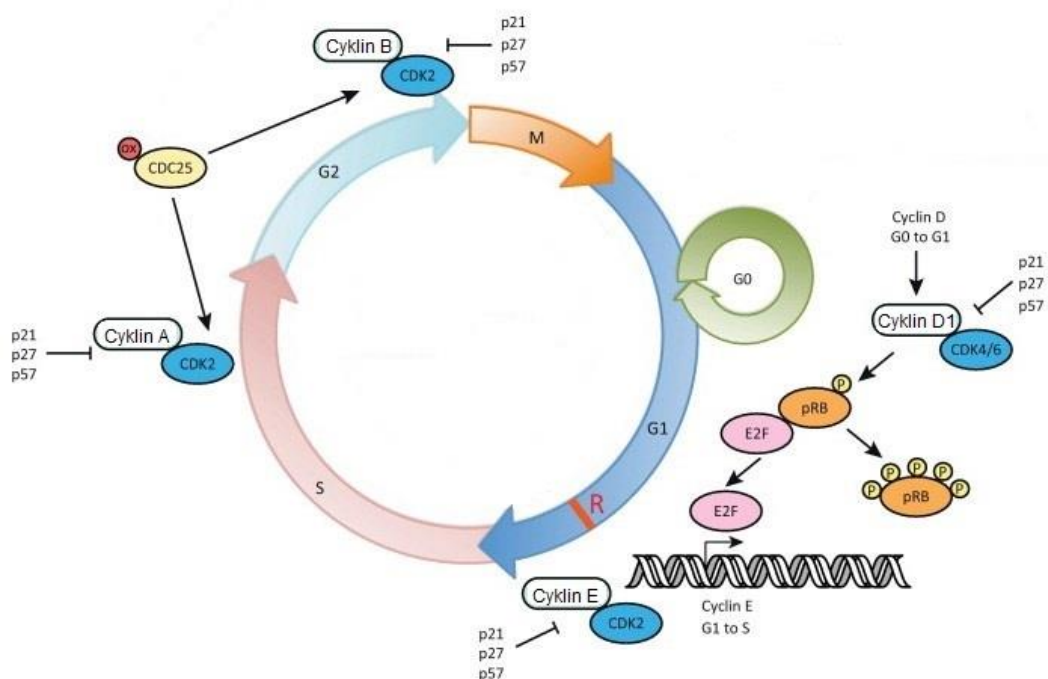
CDK-cyklin komplexy jsou také zodpovědné za quiescenci v G1 fázi. Dospělá tkáň se vyznačuje kmenovými buňkami v quiescenci a dceřinými progenitorovými buňkami s vysokou proliferační kapacitou. Quiescence je mechanismus, který chrání buňky před vyčerpáním její proliferační kapacity, tak aby se byly schopné dělit napříč životem jedince. Schopnost buňky přejít do quiescence je dána CDK-cyklin komplexy, které jsou řízeny CDK inhibitory (CKIs).

Jsou zde dvě rodiny CKI. V první rodině jsou INK4 proteiny (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} a p19^{INK4D}), které se váží pouze k CDK4 a 6 (Serrano et al., 1993; Guan et al., 1994; Hannon a Beach, 1994; Chan et al., 1995; Sherr a Roberts, 1999). V druhé rodině jsou Cip/Kip proteiny (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} a p57^{Kip2}), které řídí cyklin-(D, E a A)dependentní kinázy (Xiong et al., 1993; Toyoshima a Hunter, 1994; Lee et al., 1995; Sherr a Roberts, 1999). Tyto inhibitory tlumí proliferaci v mnoha typech kmenových buněk různých vyvinutých tkání. Zatímco u buněk

s chybějící CDK1 dochází k zastavení cyklu, u buněk s chybějícím CKIs dochází k expanzi a proliferaci kmenových buněk i dceřiných progenitorů a rakovině (Besson et al., 2007).

Mutace v D typech cyklinů, *INK4* inhibitech, *CDK4* a *CDK6* je běžná u široké škály rakovin. *CDK2* v případě lidské rakoviny běžně mutována nebývá. Pro lidské tumory je běžná overexprese E cyklinů. Naopak exprese *p21* a *p27* je často během tumorogeneze umlčena (Malumbres a Barbacid, 2001, 2009).

CDKs jsou regulovány i kontrolními body. Kontrolní body brání buňce před vstupem do další fáze, dokud není předchozí fáze dokončena. Chyba v kontrole vede k deregulaci CDKs, což také směřuje k tvorbě rakoviny (Taylor a McKeon, 1997; Bower et al., 2010).



Obrázek 2: Základní regulace buněčného cyklu (převzato a upraveno dle Chiu a Dawes, 2012)

Legenda: R restrikční bod

10 Kontrolní body

Správný průběh buněčného cyklu je hlídán kontrolními body. Jakákoliv změna v DNA, způsobena genotoxickými činidly či jinými faktory, je detekována signální dráhou, vyúsťující v CDKs inhibici a zastavení cyklu. Buňka má možnost opravit defekty, aby se nepřenesly do dceřiných buněk (Bártek et al., 2004; Malumbres a Barbacid, 2009). V případě neúspěšné opravy, buňka vstupuje do senescence nebo apoptózy (Wahl a Carr, 2001). Alternativně dojde k akumulaci chyb vedoucí ke genomické nestabilitě směřující k transformaci a onkogenezi (Kastan a Bártek, 2004).

V průběhu aktivace G1/S kontrolních bodů je klíčová činnost RB a p53 tumorových supresorů, ale i BRCA1 (Kuerbitz et al., 1992; Fabbro et al., 2004; Wu et al., 2010). Výzkumy ukázaly, že BRCA1-BARD1 heterodimer v tomto případě podmiňuje fosforylaci p53 tumorového supresoru na serinu 15 při poškození DNA od ATM a ATR kináz. Protein p53 pak dále aktivuje transkripci p21 vedoucí k buněčného cyklu v G1 kontrolním bodě (Fabbro et al., 2004; Wu et al., 2010).

Pro S kontrolní bod jsou klíčové ATM a ATR proteiny, které aktivují Chk1 a Chk2. Aktivace kináz vede k pozastavení buňky v tomto kontrolním bodě. Chk1 a Chk2 jsou současně regulovány fosfatázami CDC25 A, B a C (Zhao et al., 2002). Při poškození DNA během S-fáze ATM fosforyluje BRCA1 na serinech 1387 a 1423. Tato fosforylace BRCA1 proteinu je pro kontrolní bod důležitá (Xu et al., 2001 a 2002).

Po duplikaci DNA je buňka nadále kontrolována G2/M kontrolním bodem, který řídí CDK1 a kontroluje chromozomální segregaci (Kops et al., 2005; Musacchio a Salmon, 2007). V G2/M kontrolním bodě ATM a ATR fosforylují Chk1 a Chk2, ty pak následně fosforylují Wee1 kinázu a CDC25 A, B a C, které tlumí cyklin B a následně i CDK1 vedoucí k zastavení buněčného cyklu těsně před nástupem mitózy (O'Connell et al., 1997; Rhind et al., 1997; Wu et al., 2010). Rovněž jako v S fázi, po poškození DNA se BRCA1 aktivuje ATM fosforylací na serinových reziduích 1387 a 1423, a do značné míry pak reguluje Chk1 kinázovou aktivitu (Xu et al., 2001 a 2002; Yu and Chen, 2004).

BRCA1 tak hraje důležitou roli v regulaci S a G2/M kontrolních bodů po poškození DNA. Buňky s nedostatečností BRCA1 proteinu jsou tak defektní v zastavení v S kontrolním bodě za současného snížení replikace DNA a taktéž v G2/M kontrolním bodě (Xu et al., 2001). Dle některých prací však kontrolní body buněčného cyklu nemusí být narušeny, pokud je BRCA1 přítomna alespoň v heterozygotním stavu (Pathania et al., 2014).

11 Odpověď na poškození DNA

V buňce existuje hned několik mechanismů opravy chybné DNA: excisní oprava bází pro odstranění poškozených bází, nukleotidová excisní oprava pro odstranění větších DNA úseků s adukty a DNA cross-linky, „*mismatch*“ oprava pro odstranění chybně zařazené a poškozené báze. Dále jsou v buňce mechanismy pro opravu DNA zlomů zahrnující mechanismy HR a NHEJ.

BRCA1 hraje důležitou roli v opravách poškozené DNA. Po poškození DNA je protein fosforylovaný checkpointovými kinázami ATM a ATR a koncentruje se do místa zlomu DNA (Scully et al., 1997b a 1999). BRCA1 protein je nezbytný pro efektivní opravu DSBs pomocí procesu HR (Moynahan et al., 1999) a je také významně zapojen do procesů *transcriptional-coupled* opravy, NHEJ a nukleotidové excizní opravy (Abbott et al., 1999; Hartman a Ford, 2002; Zhong et al., 2002).

DNA poškození vznikají za přítomnosti uvolněného i kompaktního chromatinu. Lokalizace poškození do chromatinu ovlivňuje aktivaci oprav a její účinnost. Při poškození DNA obklopené kompaktním chromatinem je omezen přístup proteinů potřebných pro opravu. Pro tyto případy zasahuje ATP-dependentní mechanismus pro uvolnění chromatinu v okolí DSBs (Kruhlak et al., 2006).

Odpověď na poškozenou DNA je řízena kinázovou kaskádou řízenou *phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases* (PIKKs), viz obr. 3. Mezi kinázy patří DNA-dependentní protein-kinázy (DNA-PKcs), ATM, ATR a kinázy kontrolních bodů Chk1 a Chk2. DNA-PKcs a ATM jsou primárně zapojeny do opravy DSBs. Do odpovědi na širokou škálu poškození DNA, a to zejména během její replikace, je zapojena ATR (Cimprich a Cortez, 2008). Kinázy regulují DNA opravu prostřednictvím posttranslačních modifikací enzymů zúčastňujících se oprav, modifikací chromatinu v blízkosti poškozené DNA pro umožnění navázání proteinů zapojených do opravy a celkovou úpravou metabolismu buňky (transkripce, buněčný cyklus, aj.).

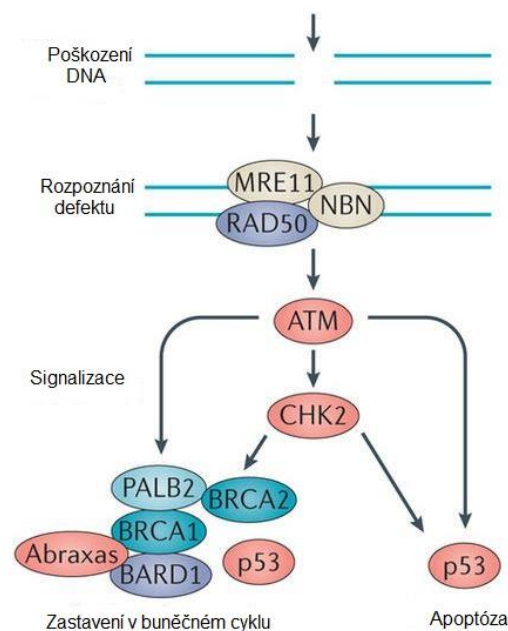
Po aktivaci kinázových kaskád při poškození DNA, se zvyšuje koncentrace CDK inhibitoru p21 nebo se naopak inhibují aktivátory CDKs, jako je např. CDC25 fosfatáza (Shiloh a Kastan, 2001; Shiloh, 2003; Bártek et al., 2004; Kastan a Bártek, 2004). Tyto mechanismy, dokud je DNA poškozena, zabraňují posunu buňky do další fáze cyklu (G1/S, G2/M).

Při DSBs se působením ATM a ATR fosforyluje chromatin-vázaný histon H2AX na evolučně silně konzervovaném serinu S139 (tato fosforylovaná forma se označuje jako γ H2AX) (Rogakou et al., 1998; Burma et al., 2001). Dále se navazuje protein MDC1 a proteinový komplex Mre11-RAD50-NBS1 (MRN). Výsledný komplex MRN, MDC1 a γ H2AX proteinů navazuje další ATM protein do okolí poškozeného chromatinu za propagace histonu γ H2AX do velké chromatinové oblasti zahrnující až několik megabází v okolí zlomu. γ H2AX je prostředníkem pro

navázání dalších proteinů potřebných k modifikaci chromatinu, signalizaci a opravě DNA (Lee a Paul, 2005; Lou et al., 2006; Savic et al., 2009). Na komplex se dále váží RNF8 a RNF168 E3 ubikvitin-ligázy. Toto navázání je zprostředkováno ATM-dependentním fosforylačním místem na MDC1 a FHA doménou RNF8 (Huen et al., 2007; Mailand et al., 2007; Doil et al., 2009). RNF8 spolu s E2 ubikvitin-konjugázou Ubc13 monoubiquityluje histony H2A a H2B v okolí místa poškození, za současné translokace BRCA1 proteinu do tohoto místa, kdy histony rozpoznává ubikvitin-rozpoznávající motiv RAP80, který tvoří s BRCA1 komplex (Wu et al., 2009, Zhao et al., 2007; Wu et al., 2009). Celý ubikvitin-konjugázový komplex je pak dále udržovaný RNF168 E3 ubikvitin-ligázou (Doil et al., 2009). Následná syntéza polyubikvitinového řetězce spojeného v místě Lys63 v oblasti dvouvláknového zlomu je katalyzována po navázání obou zmíněných ubikvitin ligáz (Huen et al., 2007; Sobhian et al., 2007).

Antagonistou syntézy ubikvitinového řetězce je RNF169 E3 ubikvitin-ligáza (Chen et al., 2012; Poulsen et al., 2012). Pozitivním regulátorem je naopak HERC2 E3 ubikvitin-ligáza. Tento protein navazuje FHA doménu RNF8 ligázy do svého fosforylačního ATM vazebného místa za shromažďování RNF8-Ubc13 (Bekker-Jensen et al., 2009).

V případě, že není poškození řádně opraveno, může následovat genová mutace, senescence, apoptóza, mitotická buněčná smrt, genomická nestabilita a tumorogeneze (Hannahan a Weinberg, 2011).



Obrázek 3: Systémová odpověď na poškození DNA (převzato a upraveno dle Nielsen et al., 2016)

11.1 Homologní rekombinace

HR patří mezi důležité procesy buňky využívané nejen k opravě DNA, ale také k dalším procesům jako je rekombinace genů zodpovědných za expresi protilátek, a také rekombinace chromozomů při meióze vedoucí ke zvýšení genetické variability jedinců. Je to jeden ze dvou nejdůležitějších opravných mechanismů DSBs a probíhá pouze během S fáze a G2 fáze, kdy je k dispozici templátová DNA v podobě nově replikované chromatidy. Při absenci tohoto mechanismu opravy je zpravidla zastoupen NHEJ. HR je označována jako tzv. *error-free* oprava, tedy zpravidla negeneruje delece ani mutace. (West 2003; Zhao et al., 2017).

HR má následující průběh, viz také obr. 5:

MRN komplex se svojí RAD50 jednotkou navazuje na DNA konce v dimeru a tvoří most mezi rozlomenou DNA (Hopfner et al., 2002; Seifert et al., 2016). Dále svojí NBS1 jednotkou interaguje s ATM a aktivuje její katalytickou funkci. ATM rovněž fosforyluje několik substrátů včetně H2AX histonu v blízkosti DNA zlomu (Lee et al., 2005; Savic et al., 2009; Matsuoka et al., 2007; Maréchal et al., 2013). Zlomené konce DNA jsou udržovány poblíž sesterské chromatidy za pomoci koheziových komplexů (Potts et al., 2006; Kong et al., 2016).

Následuje tvorba zářezů a odbourání části dvouvláknových DNA (dsDNA) na jednovláknové DNA (ssDNA) s přesahujícími 3'hydroxy konci. Proces začíná interakcí BRCA1 s CtIP, proteinem spojeným s transkripčním korepresorem CtBP (Wong et al., 1998; Yu et al., 1998). CtIP je v tomto případě spolu s BRCA1 potřebný pro samotnou resekcí DNA a navázání replikačního proteinu A (RPA) a následně ATR kinázy (Schlegel et al., 2006; Sartori et al., 2007). Do procesu se zapojuje MRN, který interaguje s CtIP asociovaným s BRCA1 a vytváří tak vhodné prostředí pro rozštěpení a odbourání vlákna DNA. ATM společně s MRN zprostředkovávají částečné odbourání DSBs z dsDNA na ssDNA. Vlákno je dále odbouráno DNA2 nebo Exo1 5'-3' exonukleázami za spolupráce s BLM helikázou (West, 2003; Greenberg et al., 2006; Svendsen et al., 2009; Nimonkar et al., 2011; Aparicio a Gautier, 2016).

ssDNA je rychle obalovaná RPA proteinem, který rozmotává sekundární struktury DNA (Chen et al., 2016). Na vlákna se následně navazuje RAD51 DNA rekombináza, která je pro proces opravy zcela nepostradatelná. Mediátorem této reakce jsou BRCA1-BARD1, BRCA2-DSS1 a PALP2 proteiny. Přímo s RAD51 interaguje pouze BRCA2 (Pellegrini et al., 2002; Yang et al., 2005; Xia et al., 2006; Sy et al., 2009; Zhang et al., 2009).

RAD51 rekombináza ve vazbě s ssDNA dále vyhledává homologní sekvenci ke zlomenému vlákně. Poté, co najde odpovídající sekvenci na sesterské chromatidě, následuje samotná rekombinace vláken. Prvně vzniká tzv. *D-loop* meziprodukt, kde 3' konce slouží jako primery navázané do sesterské chromatidy. Nové vlákno se pak syntetizuje polymerázou η za kopírování informace ze sesterské chromatidy. Když dojde ke kontaktu *D-loop* k druhému zlomenému konci, vzniká *Holiday junction* s možností *crossover* nebo *non-crossover* původních chromatid (Bianco et al., 1998; Richardson et al., 1998; Johnson a Jasin, 2000; West, 2003; McIlwraith et al., 2005).

Holiday junction (HJ) je možné posouvat po vlákně v obou směrech, tento krok umožňuje RAD54. Stejnou funkci dokáže zastoupit také WRN, BLM a RECQ4 a RECQ5 helikázy. Především působením BLM helikázy s topoizomerázy III α dochází k rozštěpení HJ tak, že výsledkem je chromatidový *non-crossover* produkt. Naopak *crossover* produkt vytváří MUS81-EME1 endonukleáza. Existují však i jiné endonukleázy katalyzující oba typy rozdělení vláken (Chen et al., 2001; Wu a Hickson, 2003; Bugreev et al., 2006; Bohr, 2008).

Interakce BRCA1 během HR jsou pro průběh opravy DSBs esenciální (Moynahan et al., 1999) nicméně buňka je dle některých publikací schopna provádět plnohodnotnou HR i v případě haploinsuficience BRCA1 proteinu. Heterozygotní BRCA1 linie tak nevykazují typickou extrémní citlivost na PARP-1 inhibitory, která je typická u linií, jimž BRCA1 zcela chybí (Pathania et al. 2014).

11.2 Nehomologní spojování volných DNA konců

NHEJ je opravný mechanismus, který se dělí na dva subtypy: klasický (cNHEJ) a alternativní (aNHEJ). Mechanismus naprosto dominantní při opravách dvouřetězcových zlomů v G1 fázi, ale setkáváme se s ním ve všech fázích buněčného cyklu. Považuje se za tzv. *error-prone*, tedy opravu vnášející chyby, neboť nevyužívá pro opravu templát. Zlomené chromozómy jsou pouze zpětně ligovány a dochází tak k typické delecii bází (Saha a Davis, 2016).

cNHEJ má nejběžněji následující průběh, viz také obr. 5:

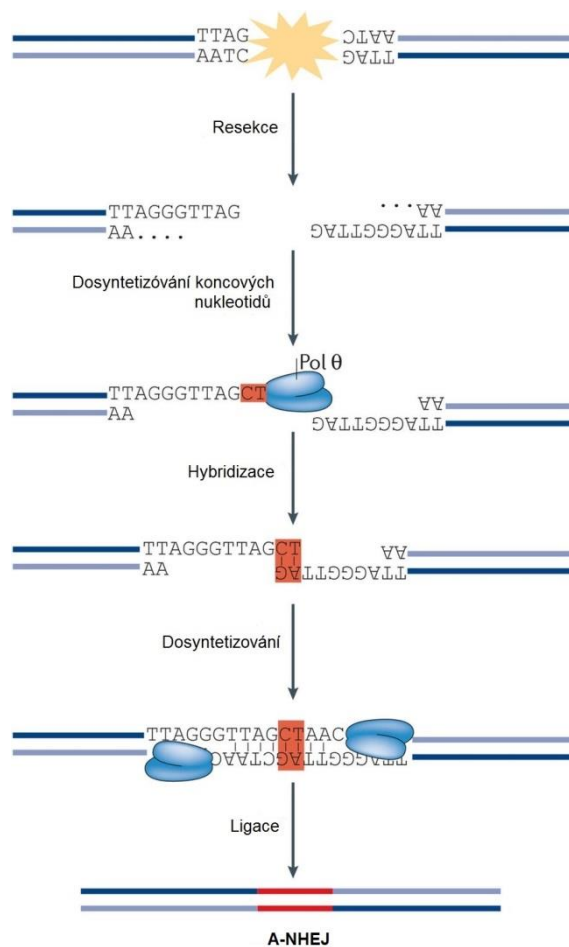
Heterodimerický komplex Ku70-Ku80 se naváže na oba konce zlomené DNA (Walker et al., 2001). Ku70-Ku80 dále navazuje kinázu DNA-PKcs a posouvá se směrem dovnitř DNA, čímž umožňuje následnou vazbu DNA-PKcs na DNA. To vede k aktivaci serin-threonin kinázové aktivity DNA-PKcs. Díky pozici Ku70-Ku80 se mohou navázat další dvě DNA-PKcs a vytvořit most mezi oběma rozlomenými vlákně. DNA-PKcs fosforyluje četné substráty, včetně Ku70, Ku80, XRCC4, XLF, Artemis exonukleázy a DNA ligázy IV, a také sama sebe. Ke koordinaci úprav pro spojení konců zlomené DNA tak vedou nejrůznější fosforylace (Yaneva et al, 1997; Yoo a Dynan, 1999; DeFazio et al., 2002; Jiang et al., 2015).

Konce DNA v místech DSBs se dále upravují enzymaticky. Mezi tyto enzymy patří Artemis, PNKP (5' kinázová a 3' fosfatázová aktivita; Habraken a Verly, 1988), APTX (procesuje meziprodukty ligace deadenylací na 5' konci, čímž vzniká 5' fosfátový konec, na kterém následně může proběhnout ligace; Ahel et al., 2006) a APLF (má endonukleázovou a 3'-5' exonukleázovou aktivitu, ale také slouží jako lešení pro XRCC4, DNA ligázu IV a XLF; Kanno et al., 2007; Grundy, 2013). Nejznámější ze jmenovaných enzymů je pro uvedenou úpravu Artemis se svojí 5'-3' exonukleázovou a endonukleázovou aktivitou (Ma et al., 2005; Hartlerode a Scully, 2010). Enzym Artemis se navazuje do místa zlomu prostřednictvím Ku70-Ku80 a jeho endonukleázová schopnost je aktivována již zmíněnou fosforylací DNA-PKcs (Ma et al., 2002; Yang et al., 2016). Dosyntetizování vzniklých mezer zprostředkovávají členové rodiny DNA polymeráz X.

Ligaci obou vláken obstarává X4-L4 komplex obsahující XRCC4, DNA ligázu IV, XLF a PAXX (Grawunder et al., 1997; Hentges et al., 2006; Xing et al., 2015). XRCC4 zde slouží jako lešení interagující s Ku70-Ku80 a DNA (Modesti, 1999; Nick McElhinny, 2000; Andres et al., 2012). XRCC4 dále interaguje s PNKP, APLF i APTX nukleázami (Lieber, 2010). XRCC4 a XLF formují dlouhý super-helikální filament, který tvoří most ve zlomu pro umožnění ligace (Wu et al., 2011). PAXX zde má funkci regulace XRCC4-DNA ligázy IV a za určitých okolností dokáže sám ligovat DSBs (Xing et al., 2015). Jak XRCC4 tak XLF stimuluje DNA ligázu IV ke spojení konců DNA (Grawunder et al., 1998; Gu et al., 2007). Ligáza dokáže navíc ligovat konce, které nejsou zcela kompatibilní (Gu et al., 2007).

Do NHEJ se rovněž zapojuje MRN komplex, jehož RAD50 jednotka asistuje při spojení konců (Hartlerode a Scully, 2009; Chiruvella et al., 2013), a WRN, který tyto konce chrání před poškozením, přičemž současně reguluje výběr mezi klasickou nebo alternativní cestou opravy (Shamanna et al., 2016). Rovněž se zapojuje tumorový supresor 53BP1. V okamžiku poškození je tento jaderný protein možné kolokalizovat společně s γ H2AX, BRCA1 a dalšími proteiny. Na svém povrchu obsahuje četná vazebná místa, která proteinu dávají schopnost fungovat jako buněčný mediátor a efektor odpovědi na dvouvláknový zlom (Weinert a Hartwell, 1988; Schultz et al., 2000; Wang et al., 2002; Difilippantonio et al., 2008; Panier a Boulton, 2013).

aNHEJ probíhá za absence faktorů jako je Ku, XRCC4 a DNA ligázy IV. Oprava je doprovázena delecemi a homologními úseky v místě zlomu (Hartlerode a Scully, 2009). Alternativou za tyto faktory jsou: XRCC1, DNA Ligáza I, DNA Ligáza III a MRN, viz obr. 4 (Chiruvella et al., 2013, Yang et al., 2016).



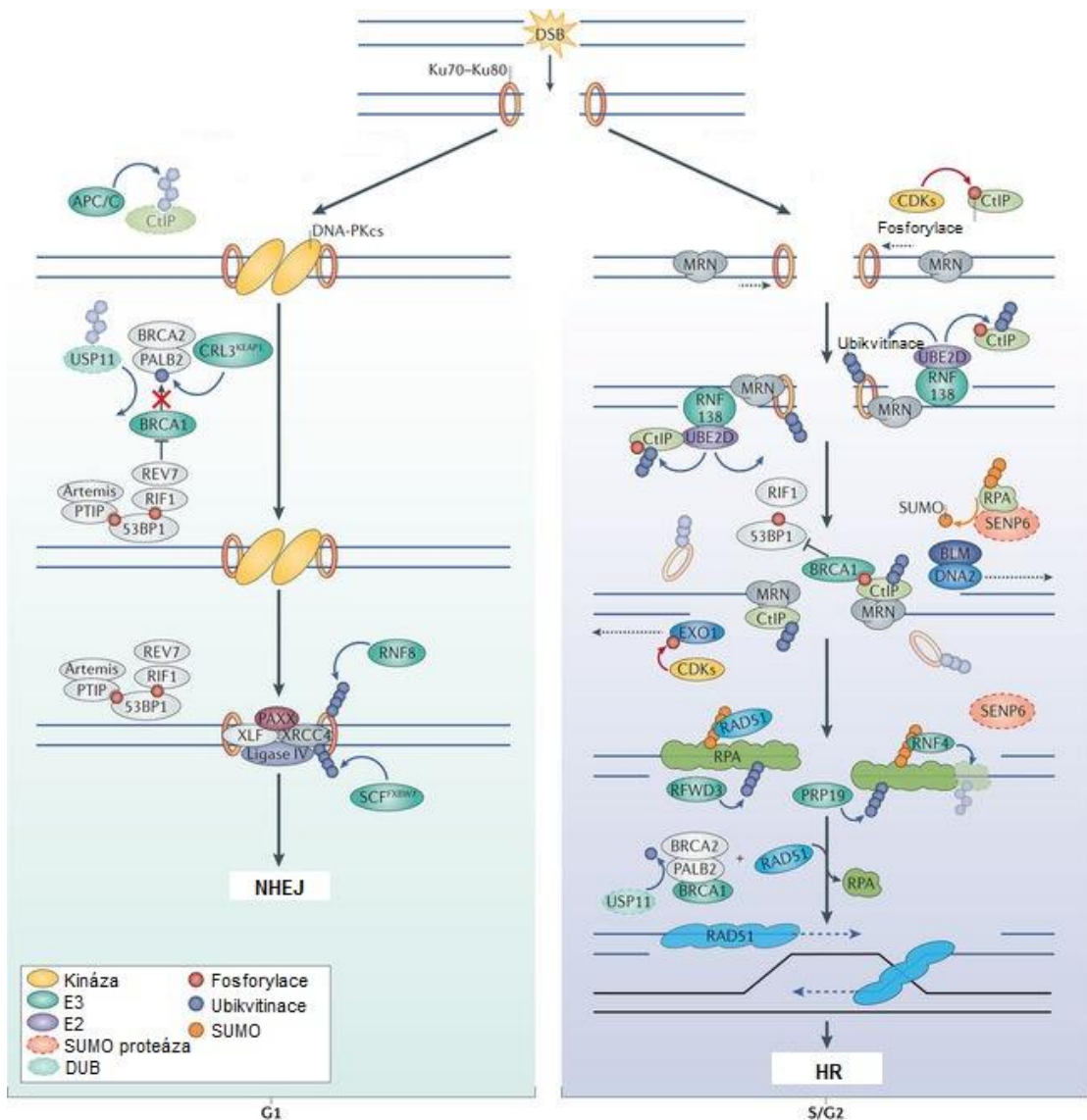
Obrázek 4: Mechanismy opravy aNHEJ (převzato a upraveno dle Lazzerini-Denchi a Sfeir, 2016)

Vliv BRCA1 na cNHEJ se v různých publikacích prezentuje různě, viz také kapitola Haploinsuficience BRCA1. BRCA1 protein pravděpodobně hraje roli ve stabilizaci Ku70-Ku80 a jeho navazování do místa zlomu během G1, ale ne v jiných fázích buněčného cyklu (Zhang et al., 2004; Jiang et al., 2013). Umlčení BRCA1, ale nevede ke kompletnímu selhání navázání Ku70-Ku80 do místa poškození. To naznačuje, že NHEJ zahrnuje další dráhu umožňující cNHEJ, bez ohledu na přítomnost BRCA1 (Jiang et al., 2013). BRCA1 dokáže regulovat NHEJ i během S fáze a to atenuací autofosforylace DNA-PKcs na serinu 2056. Naopak inhibice fosforylace vede k upřednostnění HR (Davis et al., 2015).

Další rozpory v publikacích se objevují pro vliv BRCA1 na aNHEJ. BRCA1-CtIP heterodimer je potřebný pro navázání enzymu *poly(ADP-ribose) polymerase 1* (PARP-1), který je nezbytný pro aNHEJ, do místa poškození. Jiná publikovaná data naopak říkají, že BRCA1-BACH1 blokuje aNHEJ (Dohrn et al., 2012; Badie et al., 2015). Dle Saha a Davis (2016) BRCA1 za normálních okolností blokuje aNHEJ, ale dokáže ji podpořit v okamžiku absence cNHEJ.

Mimo již zmíněné interakce, BRCA1 do opravy přispívá prostřednictvím MRN komplexu, který se zapojuje jak do NHEJ, tak do HR (Fu et al., 2003, Wu et al., 2010). BRCA1 tak může tlumit nukleázovou aktivitu MRE11 a je zapojena do ATM-dependentní fosforylace NBS1 (Zhong et al., 1999; Foray et al., 2003). Inhibice nukleázové aktivity je možná cesta, jakým BRCA1 podporuje cNHEJ oproti aNHEJ, neboť právě MRE11 je součástí dráhy aNHEJ (Paull et al., 2001).

Existují dva komplexy, které se navzájem ovlivňují a působí jako antagonisté a rozhodují o tom, zda se buňka začne opravovat NHEJ nebo HR. Tyto dva komplexy jsou BRCA1-CtIP podporující HR, a 53BP1-RIF1-PTIP podporující cNHEJ. Během S fáze BRCA1-CtIP odstraňuje 53BP1-RIF1-PTIP z místa zlomu a iniciuje HR. Naopak v průběhu G1 53BP1-RIF1-PTIP blokuje komplex BRCA1-CtIP a iniciují cNHEJ (Feng et al., 2015).



Obrázek 5: Mechanismy opravy cNHEJ a HR (převzato a upraveno dle Schwertman et al., 2016)

11.3 Oprava zastavené replikační vidlice

V okamžiku poškození DNA a zastavení replikační vidlice se na tuto vidlici navazují proteiny, které hrají roli ve stabilizaci, opravě a opětném započetí replikace. Proces je nezbytným opatřením proti zhroucení vidlice a vzniku DSBs a následné možnosti genomové nestability, viz obr 6.

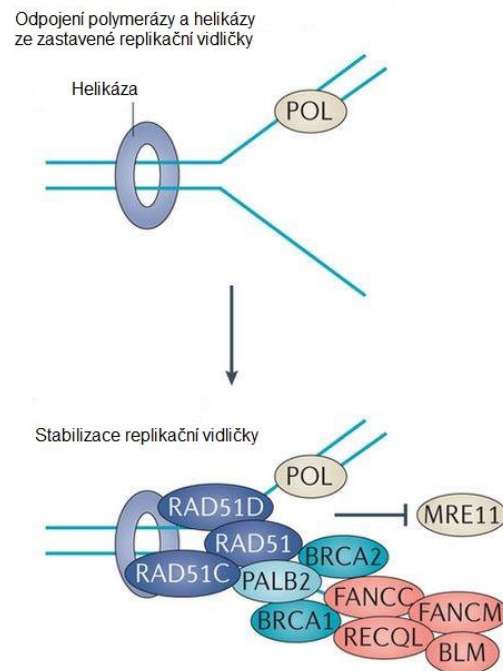
Pro znovuobnovení replikace po odstranění poškození je důležitá ATR kináza. V nepřítomnosti ATR chybí i DNA polymeráza α a ϵ za vzniku chybných DNA struktur (Sogo et al., 2002; Cobb et al., 2003 a 2005). ATR fosforyluje Chk1, který chrání replikační vidlici před zhroucením a reguluje vznik nového replikačního počátku (Liu et al., 2001; Shechter et al., 2004; Paulsen a Cimprich, 2007). Dále fosforyluje komponenty replisomu a proteiny, které replikační vidlici zastavují (Cortez et al., 2004; Matsuoka et al., 2007).

BRCA1 se naváže do místa poškození DNA za následného navázání dalších nezbytných opravných proteinů a způsobí zastavení replikační vidlice (Pathania et al., 2011 a 2014). Za nepřítomnosti BRCA1, vidlice v místě DNA poškození zpravidla zkolabuje a dochází ke vzniku DSBs (Gorgoulis et al., 2005; Pathania et al., 2014). Dle publikace Pathania et al. (2014) jsou k zastavení a stabilizaci replikační vidlice v místě zlomu, či v případě replikačního stresu potřeba obě alely BRCA1 funkční. Jedná se tedy o proces pravděpodobně velmi náročný na celkový *pool* volného BRCA1 proteinu. V případě heterozygoty je defektnost BRCA1-dependentních procesů při stabilizaci replikačních vidlic manifestována například při indukci replikačního stresu aphidikolinem (inhibitor replikativních polymeráz) (Pathania et al., 2011 a 2014).

Dalším důležitým proteinem pro opravu zastavené replikační vidlice pomocí HR je RAD51 spolu s BRCA2 (Patermann et al., 2010). BRCA2 je klíčovým článkem pro navázání RAD51 do místa poškození DNA vedoucí k rekombinaci vláken (Chandramouly et al., 2011). RAD51 protein se však váže na fosforylovaný RPA, který pokrývá ssDNA v místě zastavené replikační vidlice a vazba fosforylovaného RPA je do značné míry závislá na BRCA1. Nepřímo tak BRCA1 ovlivňuje i vazbu RAD51 (Pathania et al., 2014). Dalším BRCA1 partnerem je CtIP, který taktéž hraje roli ve znovuobnovení replikace (Wong et al., 1998; Yeo et al., 2014). Stejně jako u předchozího příkladu je i navázání CtIP do místa zastavení replikační vidlice defektní v přítomnosti pouze jediné funkční alely BRCA1 (Pathania et al., 2014).

Mezi další faktory napomáhající znovuobnovení replikace v místě zastavení replikační vidlice patří Mre11 nukleáza. Její funkce je resekce a započetí oprav v tomto místě (Trenz et al., 2006; Schlachel et al., 2011; Hashimoto et al., 2012).

Překřížení vazeb v DNA běžně vede k zastavení replikační vidlice a aktivaci ATR, který fosforyluje několik *Fanconi anemia* proteinů, což je nezbytné pro průběh opravy překřížení vazeb (DNA cross-linků) (Matsuoka et al., 2007; Wilson et al., 2007; Collins et al., 2009; Sirbu a Cortez, 2013). Jako první se do místa zastavené replikační vidlice navazuje FANCOM helikázou (Meetei et al., 2005). Ta umožňuje navázání FA core complexu, tj. ubiquitin ligazy, který monoubiquitínuje FANCD2-FANCI komplex (Garcia-Higuera et al., 2001). Následně jsou na obou stranách překřížení provedeny zářezy za pomoci endonukleázy FAN1, která rozpoznává monoubiquitinovaný FANCD2 (Liu et al., 2010; Smogorzewska et al., 2010). Po řezu jsou vlákna oddělena a samotná oprava je zprostředkována HR (Long et al., 2011, Sirbu a Cortez, 2013). Dále se forforylují SMARCAL1 ATPáza a WRN helikáza, které jsou využity pro opětovné zahájení syntézy vlákna DNA (Pichierri et al., 2003; Yusufzai a Kadonaga, 2008; Bansbach et al., 2009; Sobeck et al., 2009; Ammazalorso et al., 2010).



Obrázek 6: Odpověď buňky na zastavenou replikační vidlici (převzato a upraveno dle Nielsen et al., 2016)

12 Terapeutický potenciál PARP inhibitorů a dalších léčiv u BRCA1 deficientních nádorů

PARP je hlavní regulátor pro báзовou excisní opravu a opravu SSBs (Bouchard et al., 2003). Zprostředkovává některé změny chromatinu potřebné pro opravu DNA. PARP-1, spolu s PARP-2 jsou aktivovány v místě poškození DNA. Zde katalyzují formaci *poly(ADP-ribose)* polymerů na nich samotných (autoPARylace) a na blízkých substrátech (Sato a Lindahl, 1992; Amé et al., 1999; Allinson et al., 2003). PARylace, přímo nebo prostřednictvím navázaných proteinů jako je APLF a chromatin remodelující enzym CHD1L, indukuje změny ve struktuře v lokálním chromatinu. Tyto změny vedou k uvolnění chromatinu a navázání dalších proteinů potřebných pro DNA opravu (Tulin a Spradling, 2003; Ahel et al., 2008 a 2009; Rulten et al., 2008; Gottschalk et al., 2009).

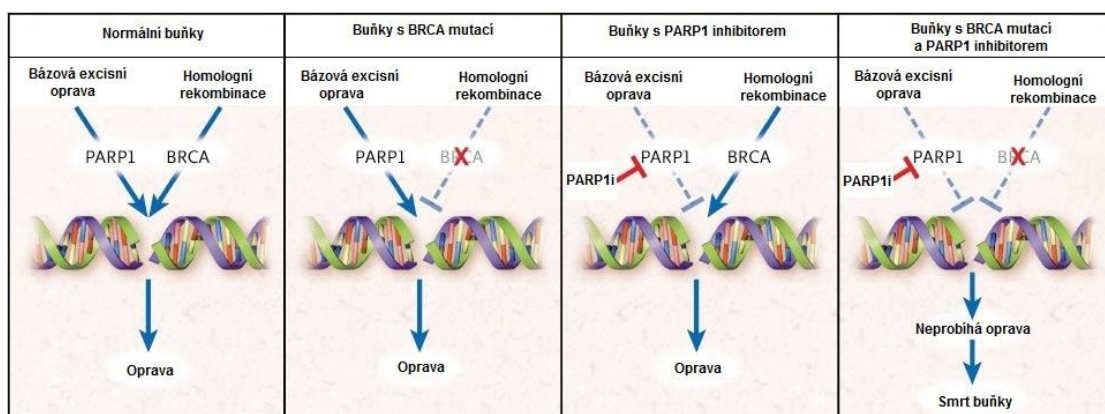
Mutace v *PARP-1* genu či jeho ztráta vede k akumulaci DNA poškození s vysokým potenciálem způsobit zastavení a případný kolaps replikační vidlice během S-fáze buněčného cyklu. Tyto defektní struktury na DNA je pak možné opravit téměř výhradně za pomoci HR. V případě zvýšeného využití HR pro opravu DSBs si buňka dokáže vytvořit toleranci ke ztrátě PARP-1 (Oikawa et al., 1980; Wang et al., 1997; Simbulan-Rosenthal et al., 1999). Buňky s defektní HR však nedokáží opravit kumulující se poškození na DNA při ztrátě PARP-1, a to vede k buněčné smrti (Helleday et al., 2005; Ashworth, 2008). Buňky BRCA1 nebo BRCA2 deficientní jsou extrémně citlivé na PARP inhibitory právě z důvodu nefunkční HR (Bryant et al., 2005).

V tomto kontextu mluvíme o syntetické letalitě, kdy samostatná ztráta jednoho buněčného mechanismu je viabilní, ale vyřazení dvou vede ke smrti, viz obr. 7 (O'Neil et al., 2017). PARP inhibitory se tak nabízejí jako terapeutikum pro léčbu rakoviny asociované s deficiencí BRCA1 nebo BRCA2 (Bryant et al., 2005). Počátek klinických testů s olaparibem (PARP inhibitor) ukázal slibné výsledky pro léčbu rakoviny asociovanou k BRCA1 nebo BRCA2 (Fong et al., 2009). Druhá fáze studií ukázala účinnost u přibližně jedné třetiny pacientů (dávka 400 mg dvakrát denně; Audeh et al., 2010; Tutt et al., 2010).

Některé rakoviny asociované s BRCA1 nebo BRCA2 se mohou stát rezistentní na PARP inhibitory, případně i chemoterapeutika způsobující překřížení vazeb. K rezistenci může dojít například po zpětné sekundární mutaci v BRCA genu, která obnoví jeho funkci, a tudíž i HR dependentní opravné mechanismy (Sakai et al., 2008; Swisher et. al., 2008; Fong et al. 2009). Mnoho těchto mutací je způsobeno posunem čtecího rámce za vzniku zkráceného produktu, který je degradován. Vystřížení lokusu zahrnujícího i mutaci, může vést k delecí jednoho či více exonu a k obnovení čtecího rámce. Vzniká sice kratší proteinový produkt, ten má však dostatečnou funkci, aby vedl k rezistenci k PARP inhibitorům a také chemoterapeutikům způsobující překřížení vazeb (Tassone et al., 2003; Sakai et al., 2008; Aly a Ganesan 2011).

Dalším možným mechanismem rezistence na PARP-1 inhibitor je souběžná ztráta BRCA1 a 53BP1. 53BP1 se podílí na rozhodování o typu opravy DNA léze a jeho absence způsobuje v nepřítomnosti BRCA1 významný posun k NHEJ. Buňka pak opravuje léze preferenčně tímto mechanismem a dále pokračuje v průchodu buněčným cyklem a překračuje G2/M kontrolní bod, bez ohledu na velké množství mutací, jež NHEJ generuje (Bouwman et al., 2010; Bunting et al., 2010; Panier a Boulton, 2013). Skupina autorů publikace Bouwman et al. (2010) zjistila, že větší část pacientů s triple negativním karcinomem prsu a rakovinou prsu asociovanou s BRCA1 deficiencí trpí právě sníženou nebo úplnou ztrátou exprese *53BP1*. Tato zjištění tak mají značný potenciál pro klinické aplikace PARP-1 inhibitorů (Bouwman et al., 2010; Bunting et al., 2010; Panier a Boulton, 2013).

Za rezistencí na PARP-1 inhibitory může být i zvýšená aktivita p-glykoproteinového efluxu, podmiňující tzv. *multiple drug resistance* (MDR) fenotyp (Rottenberg et al., 2008). Jako možné řešení rezistence na PARP-1 inhibitory by se pak mohlo ukázat souběžné užití inhibitorů p-glykoproteinových transportérů.



Obrázek 7: Princip syntetické letality u BRCA1 deficientních buněk vystavených PARP-1 inhibitorem (převzato a upraveno dle Iglehart a Silver, 2009)

13 Rakovina, její vznik a rozvoj

Průchod buněčným cyklem je stimulován růstovými faktory, u kterých normální buňka reguluje produkci a sekreci. Tyto signální molekuly podporují buněčný růst a jejich dělení napříč buněčným cyklem. Tímto způsobem se zachovává kontrolovaný počet buněk, normální vzhled a pozice vůči tkáni a její funkce. Rakovinné buňky deregulují signální molekuly za výsledné nekontrolované proliferace (Hanahan a Weinberg., 2011).

Velký podíl signálních molekul tvoří růstové faktory vázající se na povrch buněk. Obvykle obsahují tyrosin-kinázové podjednotky. Navázání na povrch buňky vyvolává signální kaskádu vedoucí k pokynu jako je postup v buněčném cyklu, růst buňky, ale také ovlivňují metabolismus buňky a její přežívání. Tyto mitogenní signály se vyznačují parakrinní signalizací (buňka produkující tyto mitogeny, ovlivňuje buňky v bezprostřední blízkosti). Signální molekuly jsou pro jejich budoucí použití shromažďovány v extracelulární matrix, čímž se jejich využití i reguluje. Dále jsou regulovány enzymy (Hanahan a Weinberg, 2011).

Rakovinné buňky si dokáží signální molekuly sami produkovat, což vede k autokrinní signalizaci (molekuly produkované buňkou se váží na receptory téže buňky). Také dokáží signalizovat normálním buňkám, aby produkovaly tyto signální molekuly (Bhowmick et al., 2004; Cheng et al., 2008). Rakovinné buňky dále zvyšují množství receptorů na svém povrchu jejich zvýšenou expresí nebo mění strukturu stávajících receptorů. Mohou se také stimulovat aktivací níže v signální kaskádě (Hanahan a Weinberg, 2011).

Není tedy překvapením, že mnoho rakovin je způsobeno právě mutací složek v této signalizaci. Jako příklad může sloužit mutace v *B-Raf* genu vedoucí k mitogenní aktivaci MAP-kinázové dráhy (Davies et al., 2002; Davies a Samuels, 2010). Případně vznikají mutací v genech zodpovědných za odpověď na zvýšenou signalizaci signálních molekul. Příkladem může sloužit mutace v *ras* genu, který za normálních okolností vede k Ras-GTPásové aktivitě. Ta je potřebná k zpětnovazebné inhibici přenosu signálu (Margarit et al., 2003).

Zvyšující se exprese genů zodpovědných za proliferační signál může vést k senescentní odpovědi, případně i k smrti buňky. V počátečních stádiích rakoviny může také docházet k degradaci chromozómů za hranici telomér, a to kvůli absenci schopnosti prodloužení telomér. Zejména při absenci p53 se tato rakovina dokáže rozvinout za doprovodu chromozomálních aberací. Případně se spustí proces senescence/apoptózy, který vznikající rakovinu zastaví (Chin et al., 1999; Vulliamy et al., 2006; Raynaud et al., 2010; Gunes et al., 2017). Na druhou stranu bylo zjištěno, že samotný tumor dokáže využít senescentní geny ve svůj prospěch (rakovinný růst, sekundární tumory, záněť a relaps), a to i v normálních buňkách (Lowe et al., 2004; Schoserrer et al., 2017).

Rakovinné buňky mají schopnost se vyhýbat účinkům růstových supresorů. Jako příklady mohou sloužit RB a p53 proteiny. RB je hlavní protein kontrolující buněčný cyklus, a to přechod z fáze G1 do fáze G2. Rozhoduje o buněčném osudu, jestli buňka vstoupí do fáze proliferace, případně do senescence či apoptózy. Za jeho nepřítomnosti buňka prochází buněčným cyklem bez zastavení (Goodrich et al., 1991; Hanahan a Weinberg, 2011; Borysov et al., 2016). p53 je regulátorem odpovídajícím na stres a na buněčné abnormality: poškození DNA, množství nukleotidů, mitogenní signály, koncentrace glukózy a oxygenace. Pokud jsou tyto faktory mimo normu, p53 buňku zastavuje v cyklování, případně spustí apoptózu (Nicol et al., 1995; Hanahan a Weinberg, 2011). Proto ztráta p53, jako senzoru poškození a výkyvů v buňce, často vede k úniku rakovinných buněk z apoptózy. Oba proteiny jsou součástí a spolupracují s velkým komplexem proteinů a v některých případech dokáže buňka do určité míry jejich nepřítomnost kompenzovat (Hanahan and Weinberg, 2011).

Při růstu běžné tkáně dochází ke kontaktní inhibici. To znamená, že se buňky přestanou dělit v okamžiku obklopení sousedními buňkami. Cílem je zabránit další proliferaci a udržet homeostázu tkáně. Tato inhibice ovšem u mnoha typů rakovin neplatí (Seluanov et al., 2009; Hanahan a Weinberg, 2011).

Jednou z nejdůležitějších rakovinných bariér je apoptóza, tedy programovaná buněčná smrt. Proces se spouští jako odpověď na různé buněčné stresy. Apoptotický proces se skládá z regulátorů a efektorů. Regulátory umožňují apoptózu dvěma hlavními způsoby: vnějším a vnitřním (zprostředkovaná mitochondriemi). V obou případech dochází k aktivaci kaspáz. To vede k proteolytickým reakcím a řetězci událostí, vedoucích k pohlcení buňky jednou ze sousedních buněk nebo fagocytem. K apoptóze dochází v závislosti na převažujících apoptotických nebo naopak antiapoptotických faktorech. Nejznámější antiapoptotickou rodinou proteinů je Bcl-2. Členové této proteinové rodiny blokují Bax a Bak proapoptotické spouštěče. Při zvýšené koncentraci dojde k transportu apoptotických proteinů do vnější mitochondriální membrány za uvolnění dalších apoptotických proteinů s nejdůležitějším cytochromem c, který spouští kaspázovou řetězovou reakci. Druhá cesta vede přes aktivaci takzvaných *death* receptorů na vnější straně membrány buňky. Po převedení signálu do vnitřního prostředí buňky se aktivuje kaspáza 8 s pokračující apoptotickou reakcí (Lockshin a Williams 1965; Indran et al., 2011). Rakovinné buňky se mohou procesu apoptózy vyhnout downregulací apoptotických faktorů, upregulací antiapoptotických faktorů a již zmíněnou ztrátou p53, aj. (Hanahan a Weinberg, 2011).

Dalším obranným buněčným mechanismem je autofágie, která je odpovědí na stres nejčastěji vyvolaný hladověním buněk (Levine a Croemer, 2007). Proces je založen na intrabuněčných vezikulách, autofagozómech, které fúzí a uvnitř rozkládají organely buňky. Tímto způsobem buňce poskytuje jednoduché molekuly jako zdroj energie. Proces je poměrně úzce spojen s apoptózou, kdy mají tyto procesy některé regulátory společné (Wang et al., 2018).

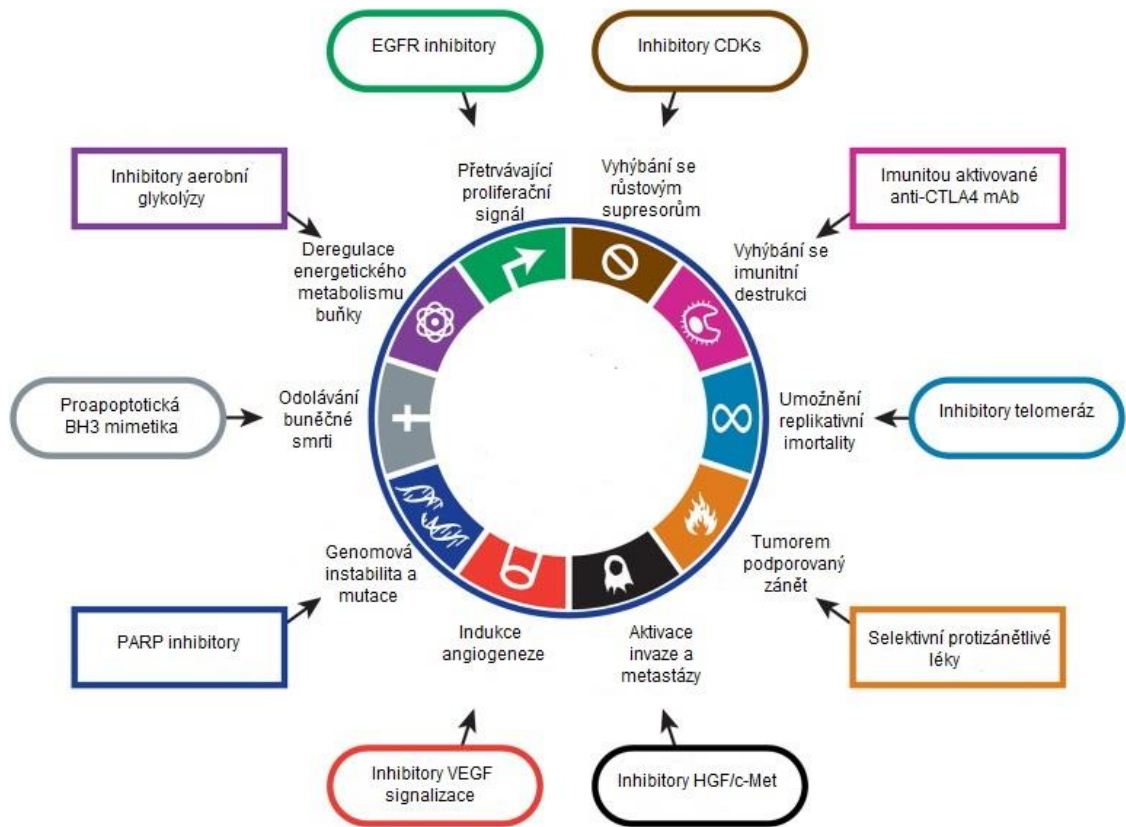
Mezi více škodlivé, než pomáhající procesy, patří nekróza. U nekrotických buněk dochází k jejich rozpadu a vylití obsahu do okolí. Vypuštěné látky do okolí mobilizují imunitní systém, a to zejména zánětlivé buňky imunitního systému. Tyto imunitní buňky mohou podporovat tumorogenezi například podporou angiogeneze, proliferace rakovinných buněk, aj. Buňka při svém rozpadu uvolňuje i řadu faktorů, které dokáží deregulovat sousední buňky za možného rozvoje rakoviny (Grivennikov et al., 2010).

Velmi typickým znakem rakovinných buněk je replikativní imortalita. U běžných buněk dochází k neustálému zkracování konců telomer a tímto procesem se limituje jejich schopnost proliferace. Po naprogramovaném počtu dělení buňka přejde do senescence a později do apoptózy. V některých případech se buňka těmito mechanismům vyhne za vzniku imortalizované buňky. Imortalizace je umožněná telomerázami, které prodlužují konce telomer a v běžných buňkách (až na výjimky) se vyskytují jen v malém množství. Rakovinné buňky si enzym obvykle dodávají upregulací jeho genu, případně alternativně rekombinací (Kim et al., 1994; Shay a Wright, 2000; Hackett a Greider, 2002; Hanahan a Weinberg, 2011).

Tvorbu tumoru doprovází i tvorba nových cév pro výživu buněk a odvod odpadních látek: vaskulogeneze a angiogeneze. U běžné tkáně jsou cévní buňky téměř neustále v quiescenci. U rakovinné tkáně je naopak tvorba cév neustále v procesu za podpory rakovinného růstu (Gimbrone et al., 1972; Kazerounian a Lawler 2017). Ovšem jsou zde i typy tumorů, u kterých se setkáváme naopak s hypovaskularizací (Olive et al., 2009).

Rakovinné buňky prodělávají určité změny, které mohou vést k invazi a metastázi. Takové změny jsou typické pro proteiny s adhezí funkcí (např.: E-Cadherin). Také dochází k upregulací genů asociovaných s migrací buněk (např.: N-Cadherin). S procesem metastázi je spojená epiteliální-mezenchymální tranzice (EMT). EMT se v těle vyskytuje přirozeně, např. při morfogenezi, hojení ran, aj., ale také se uplatňuje při rakovině, kdy umožňuje zmíněnou invazi, metastázi a dále rezistenci k apoptóze. EMT je regulováno skupinou transkripčních faktorů: Snail, Slug, Twist a Zeb1 a Zeb2, jejichž deregulace vede k agresivnější formě rakovin (Cano et al, 2000; Santamaria et al. 2017).

Do invazivního růstu přispívá i mezibuněčná komunikace (případně komunikace se stromatem) a stimulované makrofágy dodávající enzymy degradující matrix sousedních buněk (Joyce a Pollard, 2009).



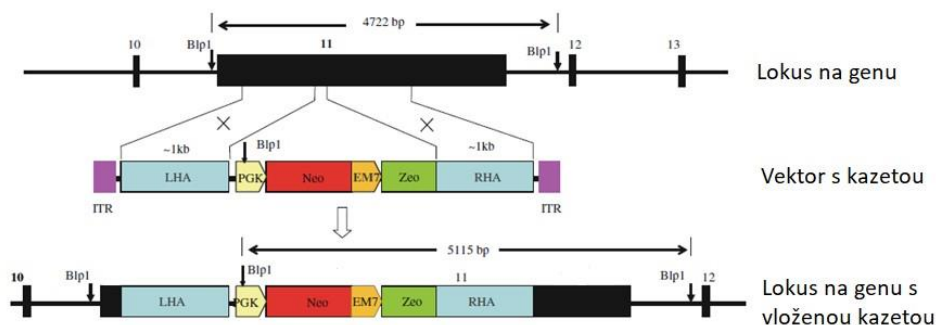
Obrázek 8: Charakteristické znaky rakovin a možnosti jejich terapeutického zacílení (převzato a upraveno dle Hanahan a Weinberg, 2011)

14 Materiál a metody

14.1 Biologický materiál

V této práci byly použity 4 buněčné linie primárních porcinních fibroblastů ze selat yukatánských miniaturních prasat stejného stáří a linie lidské rakoviny prostaty DU145, viz tab. 1. Buněčné linie byly kultivovány v nízkých pasážích v RPMI médiu při 37 °C v prostředí 5% CO₂.

Primární porcinní fibroblasty byly získány od autorů publikace Luo et al. (2011), kteří tyto GMO porciny vytvořili a z nich vygenerovali použité buněčné linie. Porcinní modely byly vytvořeny za pomoci rekombinantního adenoviru a *hand-made* klonování. Adenovirový vektor obsahoval dvě homologní ramena k exonu 11 porcinní *BRCA1* a transgenní kazetu zahrnující selekční markery. Tímto virem byly infikovány porcinní fibroblasty, z kterých se použila jádra pro tvorbu embryí. Embrya byla vložena do prasnic a po narození selat byly z ucha odebrány buněčné linie primárních porcinních fibroblastů. Výsledkem byly buněčné linie s mutovanou alelou proteinu exprimující zkrácený produkt *BRCA1* z důvodu alternativního sestřihu, viz obr. 9.



Obrázek 9: Schéma genového lokusu *BRCA1* a vložené transgenní kazety (převzato a upraveno dle Luo et al., 2011).

Legenda: Bsp1 restrikční endonukleáza, EM7 promotor, ITR obrácená terminální opakování, LHA levé homologní rameno, Neo neomycin, PGK promotor, RHA pravé homologní rameno, Zeo zeocin

Tabulka 1: Seznam použitých buněčných linií

Původ	Buněčná linie	BRCA1 konstituce
Primární porcinní fibroblasty	539	+/+
Primární porcinní fibroblasty	538	+/+
Primární porcinní fibroblasty	513	+/-
Primární porcinní fibroblasty	473	+/-
Epiteliální buňky lidské rakoviny prostaty	DU145	+/+

14.2 Použité chemikálie a soupravy

30% Akrylamide/Bis Solution 29:1 (161-0156; BIO-RAD)
 4% Formaldehyd (HT501128-4L; Sigma Aldrich)
 Aphidicolin (BUT-0307-M025; Adipogen)
 Amonium persulfate (215589-100G; Sigma Aldrich)
 Azide sodium (71289; Sigma Aldrich)
 Bromphenol blue (114391; Sigma Aldrich)
 Chlorid draselný (30076-APO-G0500-1; lach:ner)
 DAPI (D9542-10MG; Sigma Aldrich)
 Dihydrogenfosforečnan draselný (30016-APO; lach:ner)
 Dimethyl Sulfoxide for cell culture (A3672,0250; AppliChem)
 DL-Dithiothreitol (D0632-25G; Sigma Aldrich)
 DMEM High Glucose w/ Stable Glutamine, W/ Sodium Pyruvate (LM-D1110/500; Biosera)
 FBS Fetal Bovine Serum 10270 (10270-106; Gibco®; Thermo Fisher Scientific)
 Glycerín bezvodý (14550-11000; Penta)
 Glycin (G8898-1KG; Sigma Aldrich)
 Hoechst33342 (H3570; Thermo Fisher Scientific)
 Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát (12340-31000; Penta)
 Immersol™ 518 F (12-624-66B; Zeiss)
 KU 0058948 hydrochloride (2001; Axonmedchem)
 Kyselina octová ledová (19990-11000; Penta)
 Methylalkohol p.a. (21210-20010; Penta)
 Nitrocelulózová membrána 0,45 µm (1620115; BIO-RAD)
 Penicillin-Streptomycin (P4333-100ML; Sigma Aldrich)
 Phenazine methosulfate (P9625-5G; Sigma Aldrich)
 Pierce™ BCA Protein Assay Kit (23225, Thermo Fisher Scientific)
 Ponceau S (P3504-10G; Sigma Aldrich)

Precision Plus Protein™ Standard Dual Color (161-0374; BIO-RAD)

Protilátky, viz tab. 2

RPMI-1640 Medium, Modified with sodium bicarbonate, without L-glutamine and phenol red (R7509-500ML; Sigma Aldrich)

RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX™-I (61870-010; Gibco®; Thermo Fisher Scientific)

Sodium chloride (31434-5KG-R; Sigma Aldrich)

Sodium dodecyl sulfate (71729-500G; Sigma Aldrich)

SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (34095; Thermo Fisher Scientific)

SuperSignal® West Pico Maximum Sensitivity Substrate (34080; Thermo Fisher Scientific)

Sušené mléko odtučněné (Laktino)

N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine; TEMED (T9281-25ML, Sigma Aldrich)

Tris (37180.04; SERVA)

TritonX 100 (3051.2; ROTH)

Tween 20/Polysorbate 20 (103168; MP Biomedicals)

Trypsin TrypLE™ Express (+) Phenol Red (12605-028; Gibco®; Thermo Fisher Scientific)

VECTASHIELD® Mounting Medium (H-1000, Vector Laboratories)

XTT sodium salt (A2240,0500; Applichem)

Tabulka 2: Seznam použitých protilátek

Protilátka	Klon	Původ	Výrobce	Kat. číslo
Anti-53BP1	H-300	Rabbit	Santa Cruz	sc22760
Anti-β-aktin	C-4	Mouse	Santa Cruz	sc47778
Anti-BRCA1	I-20	Rabbit	Santa Cruz	cs646
Anti-cyklin A	H-3	Mouse	Santa Cruz	sc271645
Anti-RAD51	poly	Rabbit	Abcam	ab63801
Anti-γH2AX	JBW301	Mouse	Millipore	05-636
Anti-RPA	RPA34-19	Mouse	Abcam	ab16855
Anti-RPA (p-S4/8)	poly	Rabbit	Bethyl Laboratories	A300-245A
Alexa Fluor 488, anti-mouse IgG	poly	Goat	Invitrogen	A11001
Alexa Fluor 568, anti-rabbit IgG	poly	Goat	Invitrogen	A11036
Peroxidase linked Anti-Rabbit IgG	poly	Donkey	GE Healthcare	NA934V
Peroxidase linked Anti-Mouse IgG	poly	Sheep	GE Healthcare	NA931V

14.3 Použité roztoky

0,1% Ponceau S prášek v 5% kyselině octové

0,5% TritonX v 1x PBS

10% APS ve vodě

10% SDS ve vodě

10x PBS (1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄, H₂O)

10x Tris-Glycin-SDS *Running* pufr (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % SDS, H₂O)

10x Tris-Glycin *Transfer* pufr (192 mM Glycin, 25 mM Tris, H₂O, 10 % metanol)

1,5 M Tris ve vodě

1x PBS-Tween 20 (0,1%)

1x PBS-Tween 20-*Milk* (5%)

2% roztok DAPI prášek ve vodě

4x LSB lyzační pufr (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 10 % Glycerol, 2 % SDS, 0,01 % bromphenol blue, 0,5 M DTT, H₂O)

50 mM Aphidikolin ve vodě

ABD (DMEM, 10 % FBS, 0,02 % azide)

Rozdělovací SDS-PAGE gel (6 % akrylamid, 375 mM Tris pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,08 % TEMED; H₂O)

RPMI médium (10 % FBS, 1 % Penstrep)

XTT aktivátor (1,25 mM phenazine methosulfate ve vodě)

XTT pracovní roztok (XTT reagensie, XTT aktivátor 50:1)

XTT reagensie (0,09 % XTT sodium salt; RPMI-1640, Modified with sodium bicarbonate, without L-glutamine and phenol red)

Zaostřovací SDS-PAGE gel (5 % akrylamid, 65 mM Tris pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,01 % TEMED; H₂O)

14.4 Přístroje

Automatické pipety (Eppendorf Research plus; Discovery Comfort)

Biologický iradiátor (RS225; Xstrahl LTD)

Elektrobloter (OWL HEP-1; Thermo Fisher Scientific)

Centrifuga (Scanspeed 1236R; LaboGene)

Elektroforeza (Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell; BIO-RAD)

Fluorescenční mikroskop (IX81, Cell[^]R/scan[^]R system; Olympus)

Incubátor (HERAcell 150i CO₂ Incubator; Trigon-Plus[®])

Laminární box (HERAsafe KS; Trigon-Plus[®])

Mikrocentrifuga (Smart 15 Micro Centrifuge; Hanilbiomed Co., Ltd.)
Mikroskop (Primo Vert; Zeiss)
Minicentrifuga (MyFuge™ Mini; Benchmark)
Mrazák (Innova® U725; Eppendorf)
Pipetor (TPP Turbo Fix Pipet-Aid; Techno Plastic Products)
Počítačka buněk (Vi-Cell XR; Beckman Coulter®)
Spektrometr (Infinite 200 PRO NanoQuant Plate™; Tecan)
Termotřepačka (Thermo-Shaker TS-100C; BioSan)
Třepačka (PSU-10i Orbital Shaker; Grant-bio)
Vodní lázeň (WNB 45; Memmert)
Vortex (Vortex Genius 3; IKA)
Zdroj (EV202 Electrophoresis power supply; Consort)
Zobrazovací zařízení (ChemiDoc™ XRS+ System; BioRad)

14.5 Metody

14.5.1 Pasážování buněk

V případě vysokého počtu buněk byl provedeno jejich pasážování. Z kultivační láhve bylo odsáto medium a buňky byly opláchnuty 1xPBS. Z kultivační láhve bylo odsáto 1xPBS a byl připipetován trypsin pro uvolnění adherovaných buněk ke dnu kultivační láhve. Buňky byly inkubovány s trypsinem několik min., dokud se všechny buňky neuvolnily. Následně byl obsah kultivační láhve (trypsin s buňkami) přenesen do 15ml falkony k několika ml media. Do nové kultivační láhve byla napipetována polovina objemu trypsinizovaných buněk a kultivační láhev byla doplněna do objemu čerstvým médiem. Kvůli citlivosti buněk byla vždy vrácena i část původního media k nově vysazeným buňkám.

14.5.2 Rozmrazování buněk

Protože se buňky při vyšších pasážích chovaly odlišně a dávaly odlišné výsledky, bylo třeba pravidelně rozmrazovat nové buňky. Buňky byly skladovány v mrazáku při -80 °C. Po rychlém rozmrazení ve vodní lázni byly přepipetovány z kryozkumavky do 15ml falkony k 9 ml média (rychlé zředění DMSO). Následně byly tyto buňky stočeny na centrifuze. Supernatant byl odsát a pelet byl resuspendován v médiu. Obsah falkony byl přepipetován do kultivační láhve a vložen do inkubátoru.

14.5.3 Zamrazování buněk

Buňky bylo nutné v nízkých pasážích zamrazit, pro jejich pozdější opětovné rozmrazení. Z kultivační láhve bylo odsáto medium a buňky byly opláchnuty 1xPBS. Z kultivační láhve bylo odsáto 1xPBS a byl připipetován trypsin pro uvolnění adherovaných buněk ke dnu kultivační láhve. Buňky byly inkubovány s trypsinem několik min., dokud se všechny neuvolnily. Obsah láhve (trypsin s buňkami) byl přenesen do 15ml falkony k několika ml media. Následně byly buňky stočeny na centrifuze. Bylo připraveno medium pro zmrazování buněk: 50 % media, 40 % FBS, 10 % DMSO. Supernatant byl odsát a pelet byl resuspendován v médiu pro zamrazení. Obsah falkony byl rozpipetován do kryozkumavek po 1 ml. Takto připravené kryozkumavky byly pomalu zmrazeny na -80 °C

14.5.4 Western blotting

Pro detekci proteinů byla zvolena metoda *western blotting*. Buňky byly vysazeny a kultivovány do subkonflunce a poté byly seškrábány do zkumavky za přítomnosti lyzačního pufru. Alternativně byly buňky spočítány a jejich známý počet byl zlyzován v lyzačním pufru (1xLSB). Vzorky byly následně zahřáty na 95 °C na 3 min. Dále byla změřena proteinová koncentrace BCA kitem. Ke vzorkům byl přidán 1xLSB obsahující bromfenolovou modř a DTT. Takto připravené vzorky byly opět zahřáty na 95 °C na 3 min.

Byl připraven 6% SDS-PAGE gel a 1x Tris-Glycin-SDS *Running* pufr z 10x zásobního roztoku. Gel byl vložen do elektroforetické komory a zalit 1x Tris-Glycin-SDS *Running* pufrem. Vzorky byly nanášeny se standardem molekulové hmotnosti do jamek gelu. Vzorky byly separovány dle své molekulové váhy v podmínkách 300 W, 20 mA, 300 V na 1,5 hod. Během elektroforetické separace byly namáčeny filtrační papíry s nitrocelulózovou membránou v 1x Tris-Glycin *Transfer* pufru. Poté byly do blotovací aparatury vloženy 3x filtrační papír, gel, nitrocelulózová membrána a 3x filtrační papír. Proteiny byly blotovány za podmínek 300 W, 150 mA, 300 V po dobu 2 hod.

Membrána byla obarvena Ponceau S (kontrola transféru/nanášky proteinů) a dále byla nařezána podle standardu molekulové hmotnosti na díly odpovídající jednotlivým proteinům. Membrány byly opláchnuty v 1x PBS-Tween 20. Poté bylo 1 hod. blokováno pozadí v PBS-Tween 20-*milk*. Na jednotlivé membrány byly nanášeny primární protilátky v PBS-Tween 20-*milk* a byly inkubovány přes noc při teplotě 4 °C. Druhý den byly membrány promývány 3x10 min. v PBS-Tween 20. Membrány byly 1 hod. inkubovány v sekundárních protilátkách v PBS-Tween 20-*milk* a opět promyty 3x10 min v PBS-Tween 20.

Proteiny byly vizualizovány pod UV transiluminátorem po nanesení West Piko/Femto Maximum Sensitivity Substrate (3:1) a obrázky byly zpracovány v programu Image Lab. Dodatečné úpravy obrázků byly provedeny v programu Adobe Photoshop CC. Metoda byla provedena v opakováních.

14.5.5 XTT

Pro určení vlivu PARP-1 inhibitoru na buněčné linie byl zvolen XTT test. Jedná se o kolorimetrickou analýzu podávající informace o viabilitě buněk. Pro test byly vysazeny buněčné linie na 96ti-jamkovou desku minimálně v triplicátu. Při subkonfluenci byl k médiu přidán PARP-1 inhibitor do konečných koncentrací 10, 5, 2,5, 1,25 a 0 μM PARP-1 inhibitoru. Buňky byly inkubovány 4 dny. Poté byl připraven XTT pracovní roztok: byly smíchány XTT reagentie s XTT aktivátorem v poměru 50:1. Pracovní roztok byl připipetován do každé jamky a poté nechán působit 2 hod. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 475 nm a 630 nm ve spektrometru a data byla zpracována programem i-controlTM 1.9 Microplate Reader software. Metoda byla provedena v opakováních.

14.5.6 Imunofluorescenční analýza

Pro určení a kvantifikaci buněčné odpovědi na dvouvláknové zlomy a zastavenou replikační vidlici byla zvolena metoda imunofluorescenční analýzy. Buňky byly vysazeny na sklíčko pro imunofluorescenční analýzu. Při subkonfluenci byly buňky **a)** ozářeny 4 Gy a inkubovány 1 hod. pro analýzu odpovědi mechanismem NHEJ (kontrola bez ozáření); **b)** ozářeny 4 Gy a inkubovány 3 hod. pro analýzu odpovědi mechanismem HR (kontrola bez ozáření); **c)** 2 dny inkubovány v 300 nM aphidikolinu (kontrola inkubována s DMSO). Vzorky byly 2x opláchnuty v 1x PBS a fixovány 15 min. v 4% formaldehydu (4 °C). Buňky byly 2x opláchnuty v 1x PBS a poté 5 min. permeabilizovány v 0,5% TritonX v PBS. Buňky byly 3x opláchnuty v 1x PBS a 1x opláchnuty v ABD pro blok pozadí. Byly naneseny primární protilátky v ABD a vzorky se nechaly inkubovat 1 hod. Vzorky byly 3x opláchnuty v 1x PBS a poté byly naneseny sekundární protilátky v ABD na 1 hod. Vzorky byly 4x opláchnuty v 1x PBS. **a)** Vzorky byly barveny Hoechst33342 v PBS a inkubovány 10 min; **b)** Poslední oplach byl proveden vodou a vzorky byly barveny DAPI ve vodě a inkubovány 2 min. Vzorky byly 3x opláchnuty 1x PBS a 1x vodou. Sklíčka se nechala uschnout. Poté byly doprostřed každého sklíčka napipetovány 4 μl Vectashieldu. Sklíčka s Vectashieldem byla překryta krycím sklíčkem a zalakována po okrajích lakem na nehty. Vzorky byly dále přichyceny lakem na nehty k podložnímu sklíčku. K nafocení preparátů byl využit fluorescenční mikroskop se softwarem Scan^R acquisition. Programem bylo vyfoceno zvolené množství polí na preparátu pod třemi různými kanály podle

využitých fluorescenčních barviv: **a)** DAPI interkalační fluorescenční barvivo značící celé jádro a emitující modré světlo bylo měřeno při vlnové délce 470 nm (excitace 350 nm); **b)** Alexa Fluor 488 barvivo navázané na sekundární protilátce emituje zelené světlo a bylo měřeno při vlnové délce 525 nm (excitace 490 nm); **c)** Alexa Fluor 568 barvivo navázané na sekundární protilátce emituje červené světlo a bylo měřeno při vlnové délce 603 nm (excitace 578 nm). Fotografie byly analyzovány programem Scan^R Analysis. Programem byla spočítána jádra a fokusy podle zvolených kritérií. Závěrečná analýza byla provedena v programu STATISTICA. Metoda byla provedena v opakováních.

14.5.7 Population dubling

Pro určení doby trvání jednoho cyklu buňky bylo provedeno *population dubling*. Na 6ti-jamkovou desku byl vysazen známý počet buněk. Buňky byly opět spočítány v okamžiku přiblížení konfluence. Pro výpočet *population dubling* byl zvolen vzorec: $DT = T \ln 2 / \ln(X_e / X_b)$, kdy T=doba inkubace, X_e = počet buněk na konci, X_b =počet buněk na začátku.

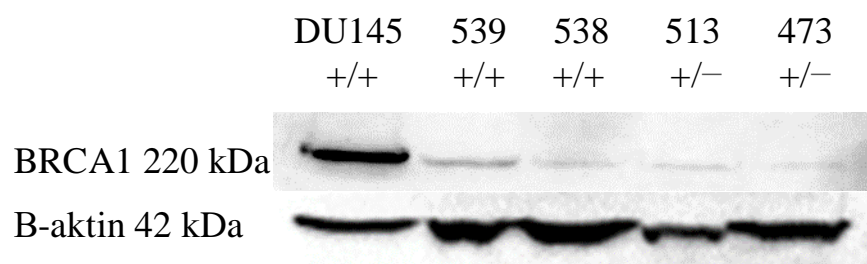
15 Výsledky

15.1 Ověření přítomnosti BRCA1 a její semikvantitativní srovnání mezi liniemi

Na testovaných liniích primárních porcinních fibroblastů bylo provedeno ověření přítomnosti BRCA1 proteinu a jejich semikvantitativní srovnání. Jako další pozitivní kontrola byla zvolena lidská rakovinná linie prostaty DU145.

Pro detekci a semikvantitativní srovnání proteinu BRCA1 byla použita metoda *western blotting*, viz obr. 10. Pro kontrolu nanášky byl zvolen β -aktin. Lyzáty vzorků byly vytvořeny ze stejných počtů buněk. Do drah gelu byly napipetovány vzorky linie lidské rakoviny prostaty a primárních porcinních fibroblastů v pořadí DU145, 539 (+/+), 538 (+/+), 513 (+/-), 473 (+/-) zleva doprava.

Protein BRCA1 byl detekován ve všech testovaných buněčných liniích. Lidské buňky oproti porcinním vykazují silnější BRCA1 signál. Jev může být způsoben mezidruhovými rozdíly člověka a prasete, dále např. buněčným typem (fibroblast vs. epiteliální buňka; primární vs. immortalizovaná buňka), distribucí buněčného cyklu a/nebo citlivostí protilátky, která je původně designovaná na lidský BRCA1. Linie 539 (+/+) oproti ostatním liniím primárních porcinních fibroblastů exprimuje více BRCA1, což odpovídá konstituci alel +/+. U linie 538 (+/+) byl detekován produkt s podobnou intenzitou, jako u obou linií +/- . Důvodem může být odlišné genetické pozadí či distribuce buněčného cyklu.



Obrázek 10: Detekované proteiny BRCA1 a β -aktinu metodou *western blotting*

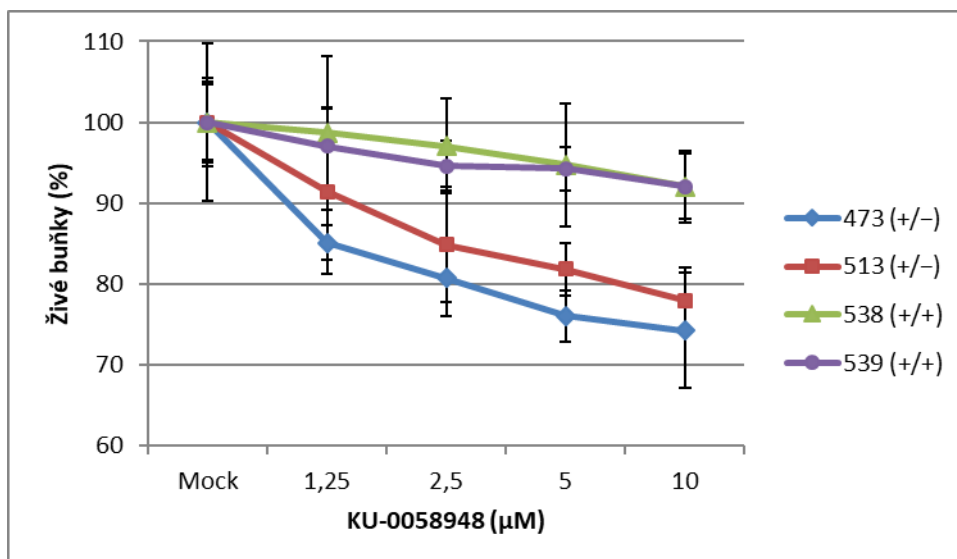
Legenda: DU145 lidská linie rakoviny prostaty; 539 (+/+), 538 (+/+), 513 (+/-), 473 (+/-) primární porcinní fibroblasty; β -aktin kontrola nanášky proteinu

15.2 Srovnání senzitivity buněčných linií na PARP-1 inhibitor KU-0058948

U buněčných linií postrádajících BRCA1 obou alel, se v kombinaci s PARP-1 inhibitory projevuje tzv. syntetická letalita. Tento efekt je způsoben absencí základních opravných mechanismů SSBs a DSBs mechanismem HR vedoucí k neschopnosti buňky opravovat zablokované replikační vidlice vyúsťující v buněčnou smrt.

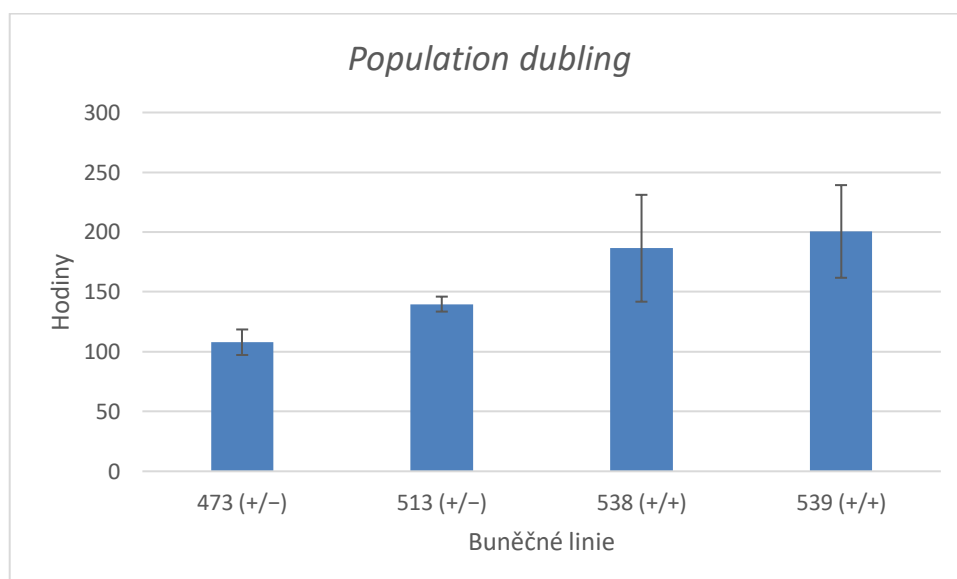
Pro účel identifikace a vyhodnocení syntetické letality buněk +/- byl zvolen XTT test, viz graf 1. Buněčné linie ++ i +/- byly vystaveny PARP-1 inhibitoru KU-0058948. Se vrůstající koncentrací PARP-1 inhibitoru klesala viabilita všech testovaných buněčných linií (klesající viabilita linií 539 (++) a 538 (++) byla způsobena přirozenou cytotoxicitou PARP-1 inhibitoru). Životaschopnost klesala pouze mírně, což bylo způsobeno absencí doplňujícího poškození DNA, např.: iradiací. I přes mírný pokles životaschopnosti buněk, byl zřetelný rozdíl v senzitivitě buněk ++ a +/- již od první koncentrace 1,25 μ M PARP-1 inhibitoru. Do koncentrace 10 μ M viabilita +/- buněk klesla pod 80 %. Okolo 90 % ++ buněk bylo v této koncentrací stále životaschopných.

Protože u lidských haploinsuficientních buněk v publikaci Pathania et al. (2014) nebyla zvýšená citlivost na PARP-1 inhibici potvrzena byl ověřen i faktor zdvojení populace buněk v kultuře (*population doubling time*). Výsledky odhalily velmi pomalý růst buněk ++ oproti buňkám +/-, viz graf 2. Nejpomaleji se v kultuře dělila linie 539 (++) s časem dělení 200 hod. O něco rychleji se dělila linie 538 (++) s časem jednoho dělení 175 hod. Linie 513 (+/-) zdvojila svojí populaci po 130 hod. a linie 473 (+/-) pak zdvojnásobila populaci po 100 hod. Rychlost růstu buněk tak negativně koreluje s citlivostí na PARP-1 inhibitor a mohla by být faktorem vysvětlující lepší snášenlivosti PARP-1 inhibitoru nezávislým na BRCA1 statutu.



Graf 1: Výsledek XTT s koncentrační řadou PARP-1 inhibitoru KU-0058948

Legenda: 539 (+/+), 538 (+/+), 513 (+/-), 473 (+/-) primární porcinní fibroblasty



Graf 2: Doba, za kterou se v kultuře zdvojí populace buněk

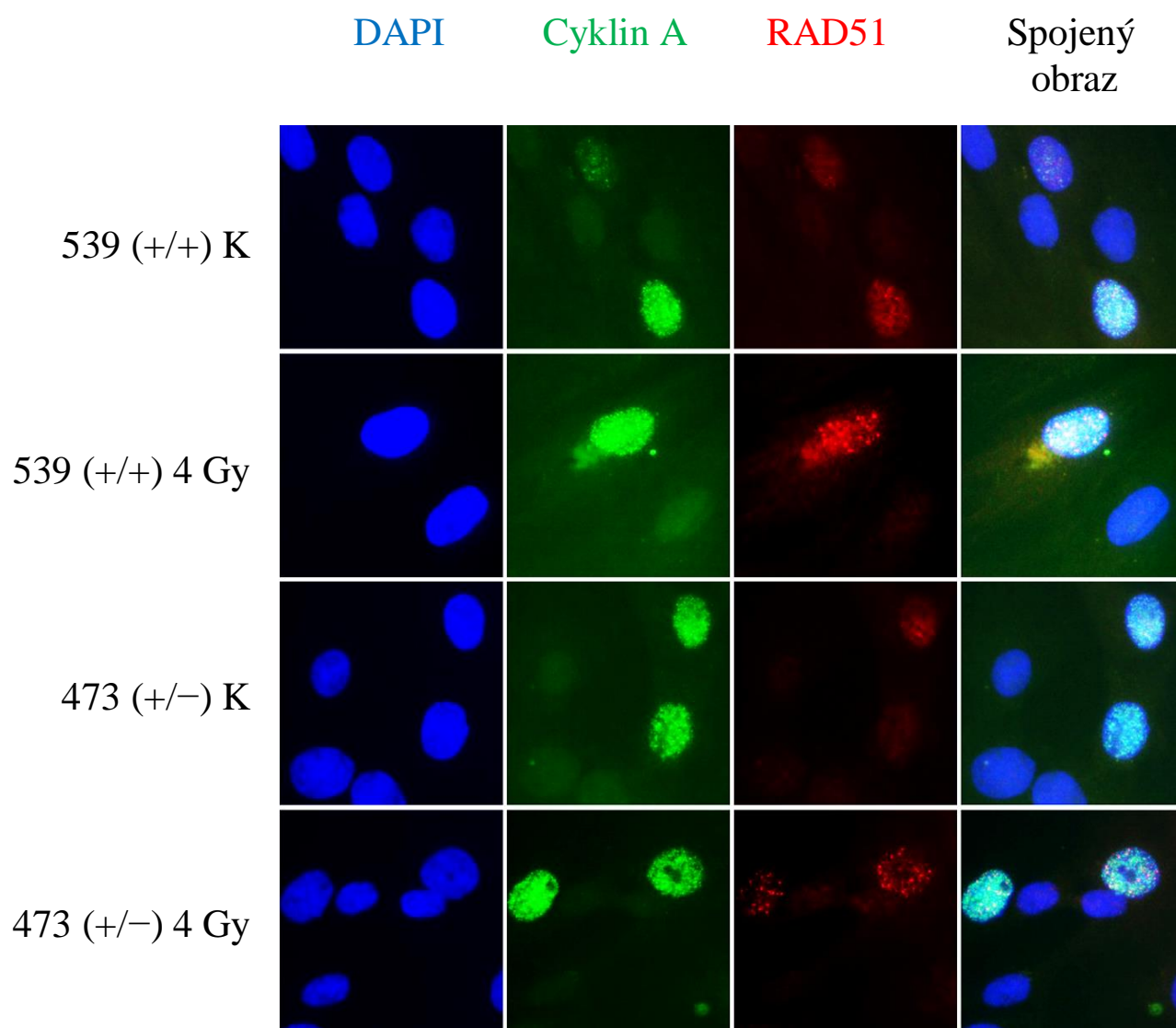
Legenda: 539 (+/+), 538 (+/+), 513 (+/-), 473 (+/-) primární porcinní fibroblasty

15.3 Porovnání odpovědi buněčných linií HR na poškození DNA

RAD51 je protein umožňující rekombinaci vláken DNA se sesterskou chromatidou pro následné dosyntetizování chybějících úseků vláken během HR. Protože BRCA1 mimo jiné zprostředkovává navázání RAD51 do místa poškození DNA a zároveň je RAD51 nedílnou součástí HR, ukazuje se tento protein jako vhodná volba pro analýzu efektivity HR.

Pro účely diplomové práce byl RAD51 analyzován pouze v cyklin A pozitivních buňkách. Cyklin A v tomto případě sloužil jako marker S a G2 fáze, kde HR probíhá. Na obrázku 11 je po ozáření 4 Gy zřetelná formace RAD51 fokusů, která u neozařených buněk téměř neprobíhá.

Během analýz byl detekován jen velmi nízký počet cyklin A pozitivních buněk u obou +/- linií. Důvodem bylo malé procento buněk v S a G2 fázích. To bylo v souladu i s jejich velmi dlouhou dobou zdvojení populace (viz výše). V případě +/- linií bylo cyklin A pozitivních buněk pro analýzu dostatek, ale vzhledem k chybějícím kontrolním buňkám je výsledná analýza HR nekvantitativní, tedy pouze prokazující schopnost všech testovaných cyklin A pozitivních buněk tvořit po gama ozáření RAD51 fokusy, a to zhruba ve stejné míře, viz. obr. 11.



Obrázek 11: Fotografie z fluorescenčního mikroskopu znázorňující odpověď RAD51 na poškození DNA a jeho kolokalizaci s cyklinem A

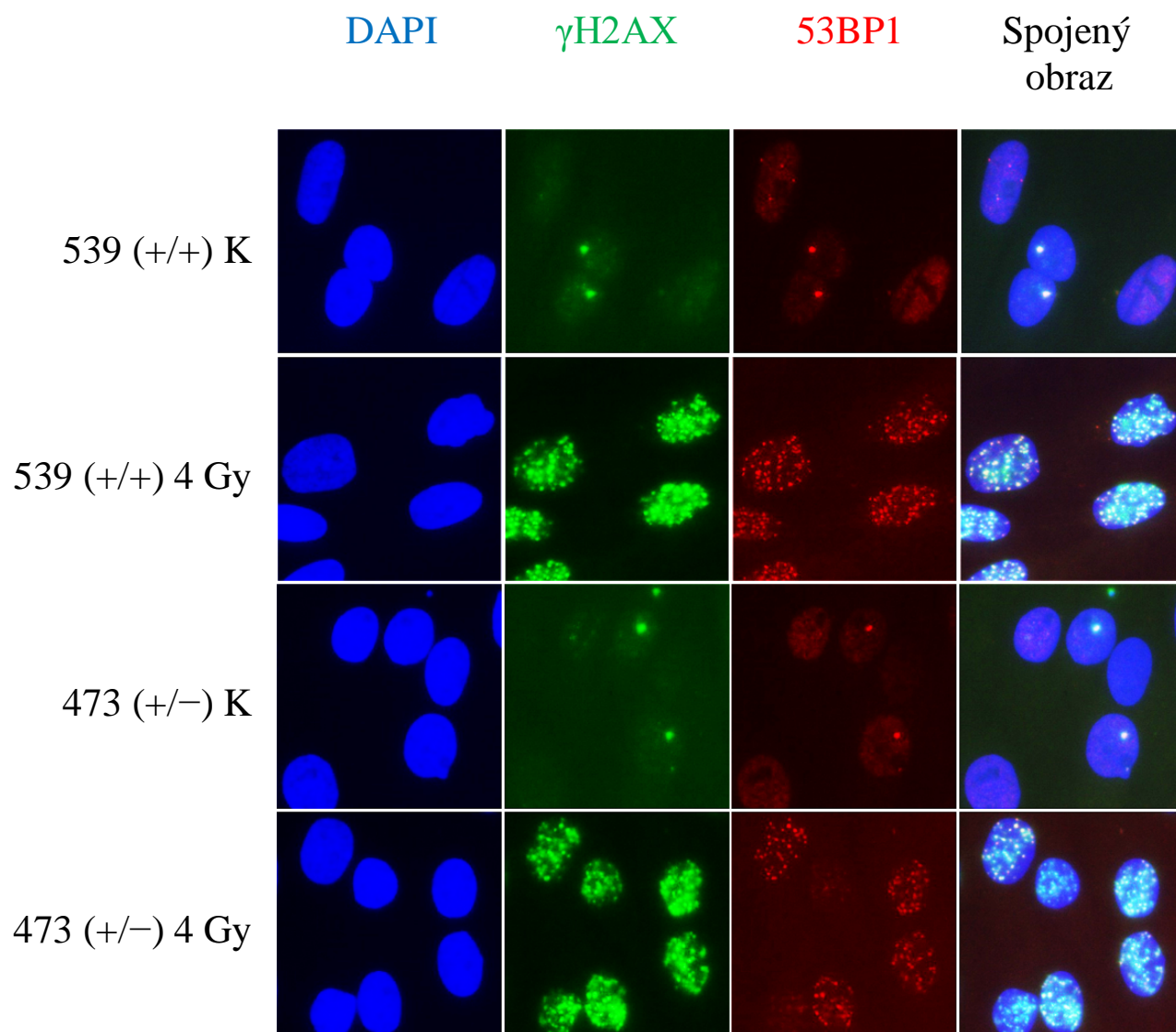
Legenda: 539 (+/+), 473 (+/-) primární porcinní fibroblasty; K kontrola

15.4 Porovnání odpovědi buněčných linií na poškození DNA mechanismem NHEJ

Se záměrem otestování efektivity odpovědi mechanismem NHEJ, byla provedena imunofluorescenční analýza proteinu γ H2AX a 53BP1 po gama ozáření. Histon γ H2AX a protein 53BP1 jsou markery obou oprav DSBs, jak HR tak NHEJ. Pro účel analýzy NHEJ byly na základě intenzity DAPI vyselektovány pouze buňky vyskytující se v G1 fázi.

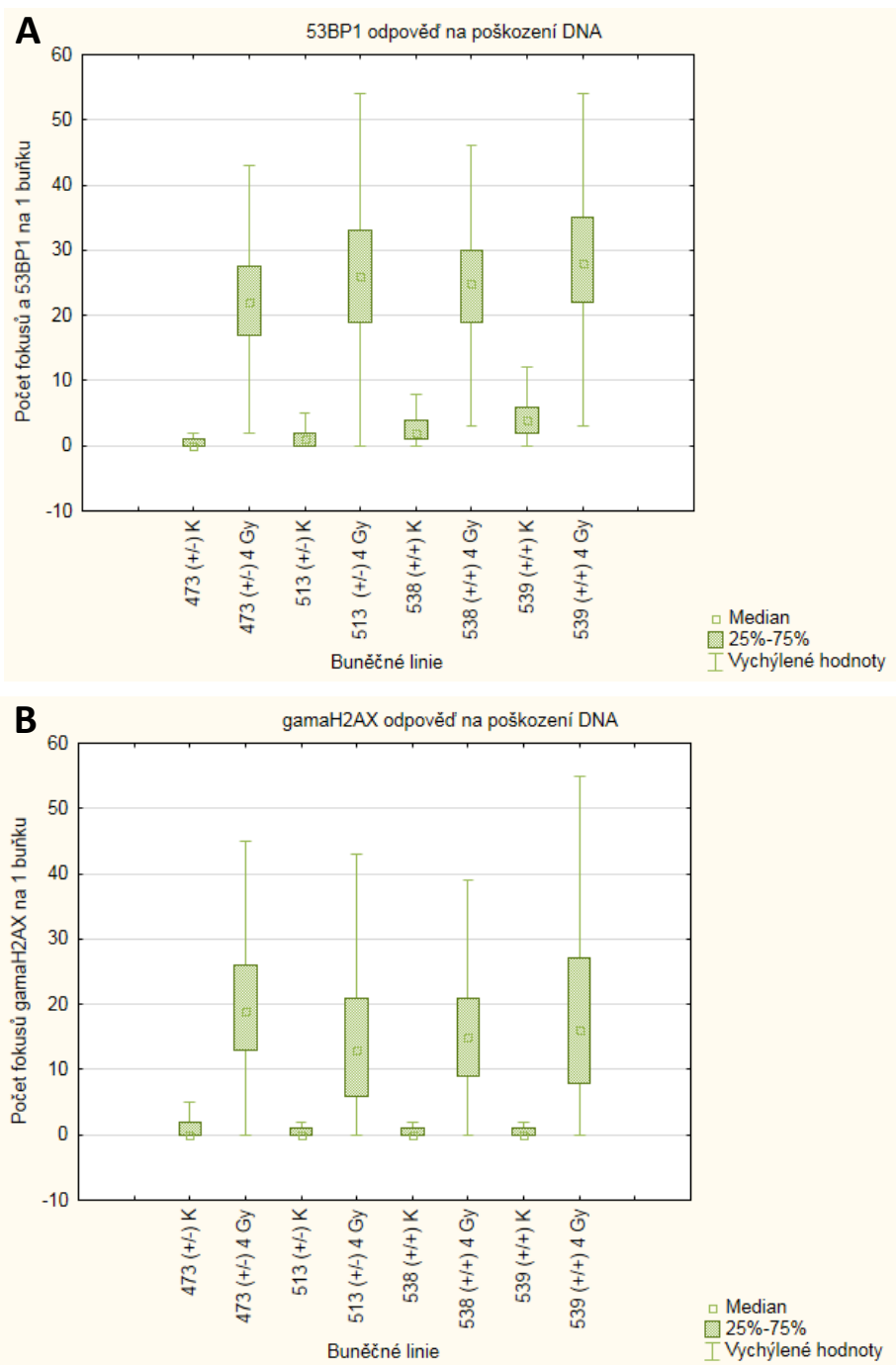
Na obrázku 12 imunofluorescenční analýzy proteinů je u kontrolních a ozářených buněk viditelný výrazný rozdíl mezi formací fokusů před a po ozáření. Neozářené kontrolní buňky nejeví téměř žádné známky spontánních oprav mechanismem NHEJ.

Dle výsledků analýzy lze říci, že se mezi sebou buněčné linie v odpovědi na poškození mechanismem NHEJ neliší, viz graf 3. U kontrolních buněk se fokusy proteinů 53BP1 a γ H2AX vyskytují v rozmezí počtu 0-2 v rámci jedné buňky. Naopak počet fokusů po ozáření 4 Gy se udržuje v rozmezí 15-25 fokusů na jednu buňku. Dle získaných výsledků primární porcinní fibroblasty s +/- konstitucí alel *BRCA1* nejsou defektní v odpovědi na poškození DNA opravným mechanismem NHEJ.



Obrázek 12: Fotografie z fluorescenčního mikroskopu znázorňující odpovědi γ H2AX s 53BP1 na poškození DNA

Legenda: 539 (+/+), 473 (+/-) primární porcinní fibroblasty; K kontrola



Graf 3: Výsledek imunofluorescenční analýzy odpovědi 53BP1 (A) a γ H2AX (B) na poškození DNA mechanismem nehomologního spojení konců

Legenda: 539 (+/+), 538 (+/+), 513 (+/-), 473 (+/-) primární porcinní fibroblasty; K kontrola

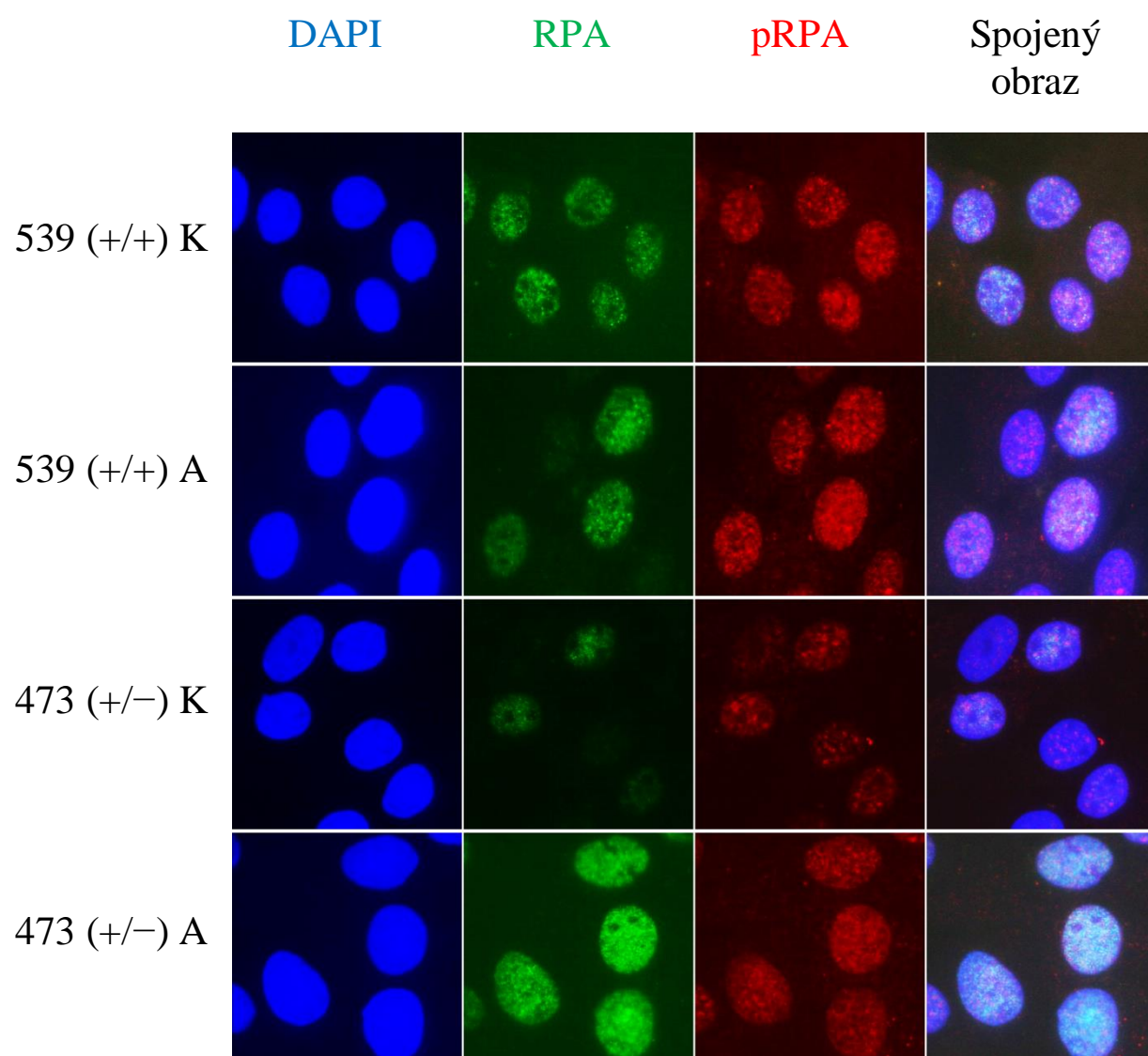
15.5 Porovnání odpovědi buněčných linií na zastavenou replikační vidlici

Oprava zastavené replikační vidlice je spojená s mechanismem HR, a proto je většina proteinů zapojujících se do procesu opravy společných s opravou DSB. Jedním z těchto proteinů je RPA32 protein, jehož fosforylovaná aktivní forma se navazuje do ssDNA během zastavení replikační vidlice a chrání tak vlákno před degradací nukleázami. Navázání proteinu je zprostředkováno BRCA1, a to pak dále umožňuje navázání RAD51. Při replikačním stresu se tak zvyšuje míra fosforylované formy RPA32.

Pro určení efektivity odpovědi na zastavenou replikační vidlici byly buněčné linie kultivovány v přítomnosti aphidikolinu (specifický inhibitor replikativních polymeráz), který pozastavuje buňky v S a G2 fázi.

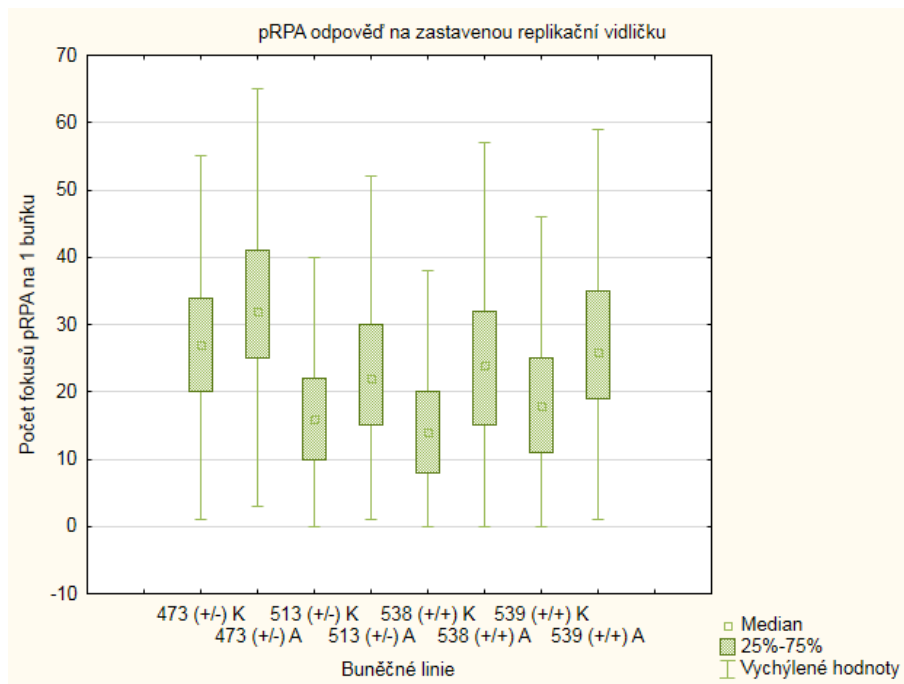
Na obrázku 14 je viditelná formace fokusů obou forem proteinu s vyšší intenzitou a četností po vystavení buněk aphidikolinu. Kvantifikace byla značně zkomplikována distribucí celkového proteinu po jádře. Z tohoto důvodu byla provedena kvantifikace pouze pRPA (S4/8).

Na základě analýzy, viz graf 3, lze říci, že počet fokusů pRPA po kultivaci s aphidikolinem významně vzrostl, a to u všech testovaných linií. Relativní míra nárůstu však není mezi liniemi významně rozdílná a data lze tedy interpretovat tak, že testované haploinsuficientní linie mají na replikační stres stejnou odpověď jako kontrolní buňky.



Obrázek 13: Fotografie z fluorescenčního mikroskopu znázorňující odpovědi RPA32 a pRPA32 na zastavenou replikační vidlici

Legenda: 539 (+/+), 473 (+/-) primární porcinní fibroblasty; A aphidikolin; K kontrola



Graf 4: Výsledek imunofluorescenční analýzy odpovědi pRPA32 na zastavenou replikační vidlici během replikace DNA

Legenda: 539 (+/+), 538 (+/+), 513 (+/-), 473 (+/-) primární porcinní fibroblasty; A aphidikolin; K kontrola

16 Diskuse

Od autorů publikace Luo et al. (2011), kteří vytvořili BRCA1 haploinsuficientní GMO prase, byly získány buněčné linie primárních porcinních fibroblastů yukatánských miniaturních prasat stejného stáří s +/- a ++ konstitucí alel *BRCA1*. Samotná +/- prasata byla vytvořena za pomoci rekombinantního adenoviru a *hand-made* klonování. Výsledkem byla selata se zkráceným proteinovým produktem z jedné alely *BRCA1* a normálním produktem z druhé alely.

Cílem této práce bylo určení, zda jsou zvolené buněčné linie významně ovlivněny v odpovědi na poškozenou DNA v konstituci +/- alel *BRCA1*. Celkem se tak analyzovaly čtyři odlišné buněčné linie: 539 (+/+), 538 (+/+), 513 (+/-) a 473 (+/-).

Western blotting metodou byla detekována BRCA1 u všech linií primárních porcinních fibroblastů +/+ a +/- . Zároveň byla pro kontrolu provedena detekce proteinu v lyzátech buněk lidské rakoviny prostaty DU145. Lidské buňky vykazovaly silnější BRCA1 signál proteinu oproti porcinním nicméně potvrdily funkčnost zvolené protilátky. Důvody pro rozdílnou míru signálu můžou zahrnovat mezidruhové rozdíly, efektivitu protilátky, distribuci buněčného cyklu a další. DU145 jsou zároveň linie epiteliální a immortalizované, což by mohlo být dalším důvodem vyšší exprese BRCA1 oproti primárním fibroblastům. Dále byla BRCA1 dle předpokladu významně více exprimovaná u linie 539 (+/+) ve srovnání s liniemi 473 (+/-) a 513 (+/-). Exprese v linii 538 (+/+) byla srovnatelná s liniemi +/- konstitucí alel *BRCA1*. Protože, každá z linií pochází z jiného jedince, je možným důvodem rozdílné genetické pozadí, ale také distribuce buněčného cyklu, hypotézy není možné bez dalšího testování ověřit.

Při poškození DNA dochází k aktivaci opravných mechanismů buňky. V případě, že buňka daný mechanismus postrádá, ztráta je vykompenzována jiným opravným mechanismem. V této souvislosti při současné inhibici PARP-1 enzymu a absenci BRCA1, dochází k tzv. syntetické letalitě, neboť buňka v jeden okamžik postrádá opravu DSBs mechanismem HR a opravu SSBs. Letalita byla v tomto případě testována u buněčných linií +/- ve srovnání s liniemi +/+ konstitucí alel *BRCA1*. Pro analýzu byl zvolen PARP-1 inhibitor KU-0058948. Výsledky ukazují vyšší citlivost +/- buněk na PARP-1 inhibitor, což poukazuje na sníženou schopnost buňky opravovat se při absenci i jediné alely *BRCA1*. Tento výsledek se liší od výsledku vydaném v publikaci Pathania et al. (2014). Vědecká skupina nepozorovala žádnou změnu v odpovědi na PARP-1 inhibitor. Rozcházející se závěry s publikací je možné vysvětlit hned několika faktory: mezidruhová rozdílnost, odlišné buněčné linie, odlišná fáze cyklu, ve které se buňky nacházely během analýzy, aj.

Po přidání PARP-1 inhibitoru KU-0058948 v koncentrační řadě bylo možné sledovat pokles viability ve všech liniích bez dodatečného poškození genomu, např. iradiací. $+/+$ buněčné linie do koncentrace 10 μM klesaly o 10 %. V tomto případě se nejedná o syntetickou letalitu, ale o cytotoxicitu látky samotné. $+/-$ buněčné linie do koncentrace 10 μM klesaly až o 15-30 %.

V návaznosti na analýzu a rozcházejí se výsledky s publikací Pathania et al. (2014) bylo provedeno vyhodnocení doby růstu a dělení buněk, tzv. *population doubling time*. Doba zdvojení buněk v kultuře odhalila výrazně delší dobu růstu u linií 539 ($+/+$) a 538 ($+/+$) oproti liniím 513 ($+/-$) a 473 ($+/-$). S delší dobou dělení koreluje i delší doba reakce na přidání inhibitoru. Je zde tedy možnost vysvětlení, že buněčné linie $+/+$ lépe přežívají po podání PARP-1 inhibitoru právě kvůli delšímu času dělení v populaci.

Rovněž byla provedena analýza efektivity odpovědi buňky na ozáření 4 Gy, a to opravnými mechanismy: homologní rekombinace a nehomologní spojení konců. Dále byla analyzována odpověď na zastavenou replikační vidlici po vystavení linií aphidikolinu.

Pro analýzu odpovědi na poškození DNA mechanismem HR byl zvolen protein RAD51. RAD51 je nedílnou součástí homologní rekombinace a je to protein zodpovědný za rekombinaci vláken pro tvorbu HJ, čímž je umožněno dosyntetizování chybějící sekvence. RAD51 byl analyzován v kolokalizaci s cyklinem A, který v tomto případě sloužil jako marker pozdní S a G2 fáze. Analýzou bylo nutné vyselektovat buňky pozitivní pouze v pozdní S a G2 fázi, neboť v buňkách přítomných v G1 fázi a brzké S fázi k HR nedochází. V těchto fázích chybí sesterská chromatida, podle které by se vlákno opravovalo (West, 2003; Zhao et al., 2017).

Po ozáření buněk byla pozorovatelná výrazně vyšší koncentrace rekombinázy do fokusů cyklin A pozitivních buněk. Samotná kvantifikace efektivity HR byla znemožněna nedostatkem získaných buněk v S a G2 fázi u kontrolních buněčných linií 539 ($+/+$) a 538 ($+/+$). Jev byl v souladu s dobou dělení buněk v populaci, která byla výrazně vyšší právě u buněčných linií s konstitucí alely *BRCA1* $+/+$.

Pro analýzu odpovědi na poškození DNA mechanismem NHEJ byly zvoleny proteiny 53BP1 a γH2AX . Oba proteiny jsou lokalizovány do místa DSBs, a proto bylo nutné analyzovat pouze buňky nacházející se v G1 fázi, kdy probíhá výhradně oprava mechanismem NHEJ. Buňky byly vyselektovány na základě intenzity DAPI.

Po ozáření buněk došlo k nárůstu signálů γH2AX a 53BP1 v jádře ve srovnání s neozářenými. Výsledky analýzy ukázaly, že se buňky v nepřítomnosti jedné funkční alely *BRCA1* dokáží opravit se stejnou efektivitou jako buňky obsahující obě funkční alely. Závěr analýzy se shoduje s publikací Pathania et al. (2014). V Baldeyron et al. (2002) však byl publikován zcela opačný výsledek. Tento tým vědců získal výsledky dokazující nedostatečnost

BRCA1 v opravném mechanismu NHEJ. Pro výzkum vědecké týmy použily odlišné buněčné linie a odlišné analytické metody.

Pro analýzu odpovědi na zastavenou replikační vidlici byl zvolen protein RPA32 a jeho aktivní fosforylovaná forma. RPA32 je protein zodpovědný za ochranu ssDNA vlákna při jejich disociaci z dsDNA. Okolo samostatných vláken se v případě poškození DNA navazuje v hyperfosforylované formě.

Buňky byly vystaveny afidikolinu, což je selektivní inhibitor replikativní polymerázy α způsobující zastavení replikační vidlice. Po podání afidikolinu došlo u všech linií k nárůstu počtu fokusů pRPA se stejnou efektivitou. Kvůli způsobu formování RPA fokusů, nebyl celkový RPA protein analyzován.

Výsledky se rozcházejí s výsledky kolektivu Pathania et al. (2014). Podle jejich publikace je BRCA1 nedostatečná právě v případě replikačního stresu, a to v případě opravy zastavené replikační vidlice a HR. Odlišné závěry lze vysvětlit faktory zmíněnými výše.

17 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo určení vlivu haploinsuficience BRCA1 u zvolených buněčných opravných mechanismů. Pro záměry práce byla analyzována případná syntetická letalita po podání PARP-1 inhibitoru. Také se analyzovala efektivita buněk v odpovědi na poškození DNA homologní rekombinací, nehomologním spojením konců a v odpovědi na zastavenou replikační vidlici. Použité metody bylo nutné optimalizovat pro použití na zvolené buněčné linie. Pro účely diplomové práce byly zvoleny primární porcinní fibroblasty s konstitucí alel *BRCA1* +/- a +/+.

Metoda *western blotting* byly detekována BRCA1 u všech zvolených linií primárních porcinních fibroblastů s nevyšším signálem u linie 539 (+/+). V linii 538 (+/+) byla detekována podobná úroveň BRCA1, jako u linií 473 (+/-) a 513 (+/-). Jedno z možných vysvětlení příčin tohoto jevu je působení skrytého genetického pozadí buněčné linie nebo i distribuce buněčného cyklu.

XTT metodou byla určena nedostatečnost BRCA1 v odpovědi na PARP-1 inhibitor KU-0058948. V souvislosti s výsledky bylo provedeno měření doby, za kterou se zdvojnásobí populace buněk. Vzhledem k výrazně delšímu času dělení +/+ buněk, je možné argumentovat opožděnou reakcí na přidaný PARP-1 inhibitor, a tedy i jejich lepším přežíváním.

Po ozáření buněk nebo jejich vystavení aphidikolinu byla u všech linií sledována zvýšená odpověď na vzniklá poškození DNA. Zvolenou metodou nebyl zaznamenán rozdíl v efektivitě odpovědi na DSBs mechanismem NHEJ a v odpovědi na zastavenou replikační vidlici.

Porcin je ideálním modelovým organismem pro člověka díky jeho podobnosti v mnoha biologických aspektech. Proto je využíváno pro výzkum nemocí, testování látek a metod (Luo et al., 2011). Mezi zkoumané onemocnění patří i rakovina prsu asociovaná s deficiencí BRCA1. V této diplomové práci se potvrdila užitečnost zvířecího modelu s potenciálem pro další testování. Ale setkáváme se i s některými limitacemi, vyplývajícími zejména z mezidruhových rozdílů.

18 Literatura

Abbott DW, Thompson ME, Robinson-Benion C, Tomlinson G, Jensen RA, Holt JT. BRCA1 expression restores radiation resistance in BRCA1-defective cancer cells through enhancement of transcription-coupled DNA repair. *J Biol Chem*. 1999 Jun;274(26):18808-12.

Ahel I, Ahel D, Matsusaka T, Clark AJ, Pines J, Boulton SJ, West SC. Poly(ADP-ribose)-binding zinc finger motifs in DNA repair/checkpoint proteins. *Nature*. 2008 Jan;451(7174):81-5.

Ahel D, Horejsí Z, Wiechens N, Polo SE, Garcia-Wilson E, Ahel I, Flynn H, Skehel M, West SC, Jackson SP, Owen-Hughes T, Boulton SJ. Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science*. 2009 Sep;325(5945):1240-3.

Ahel I, Rass U, El-Khamisy SF, Katyal S, Clements PM, McKinnon PJ, Caldecott KW, West SC. The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature*. 2006 Oct;443(7112):713-6.

Allinson SL, Dianova II, Dianov GL. Poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair: always engaged, but not essential for DNA damage processing. *Acta Biochim Pol*. 2003 Feb;50(1):169-79.

Aly A, Ganesan S. BRCA1, PARP, and 53BP1: conditional synthetic lethality and synthetic viability. *J Mol Cell Biol*. 2011 Feb;3(1):66-74.

Amé JC, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C, Apiou F, Decker P, Muller S, Höger T, Ménissier-de Murcia J, de Murcia G. PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem*. 1999 Jun;274(25):17860-8.

Ammazzalorso F, Pirzio LM, Bignami M, Franchitto A, Pichierrri P. ATR and ATM differently regulate WRN to prevent DSBs at stalled replication forks and promote replication fork recovery. *EMBO J*. 2010 Sep;29(18):3156-69.

Andres SN, Vergnes A, Ristic D, Wyman C, Modesti M, Junop M. A human XRCC4-XLF complex bridges DNA. *Nucleic Acids Res*. 2012 Feb;40(4):1868-78.

Aparicio T, Gautier J. BRCA1-CtIP interaction in the repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell Oncol*. 2016 Mar;3(4):e1169343.

Ashworth A. Drug resistance caused by reversion mutation. *Cancer Res*. 2008 Dec;68(24):10021-3.

Au WW, Henderson BR. The BRCA1 RING and BRCT domains cooperate in targeting BRCA1 to ionizing radiation-induced nuclear foci. *J Biol Chem*. 2005 Feb;280(8):6993-7001.

Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM, Scott C, Weitzel JN, Oaknin A, Loman N, Lu K, Schmutzler RK, Matulonis U, Wickens M, Tutt A. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*. 2010 Jul;376(9737):245-51.

Badie S, Carlos AR, Folio C, Okamoto K, Bouwman P, Jonkers J, Tarsounas M. BRCA1 and CtIP promote alternative non-homologous end-joining at uncapped telomeres. *EMBO J*. 2015 Feb;34(3):410-24.

Baldeyron C, Jacquemin E, Smith J, Jacquemont C, De Oliveira I, Gad S, Feunteun J, Stoppa-Lyonnet D, Papadopoulo D. A single mutated BRCA1 allele leads to impaired fidelity of double strand break end-joining. *Oncogene*. 2002 Feb;21(9):1401-10.

Bansbach CE, Bétous R, Lovejoy CA, Glick GG, Cortez D. The annealing helicase SMARCAL1 maintains genome integrity at stalled replication forks. *Genes Dev*. 2009 Oct;23(20):2405-14.

Bartek J, Lukas C, Lukas J. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Oct;5(10):792-804.

Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2000 Feb;2(2):84-9.

Bau DT, Mau YC, Shen CY. The role of BRCA1 in non-homologous end-joining. *Cancer Lett*. 2006 Aug;240(1):1-8.

Bekker-Jensen S, Rendtlew Danielsen J, Fugger K, Gromova I, Nerstedt A, Lukas C, Bartek J, Lukas J, Mailand N. HERC2 coordinates ubiquitin-dependent assembly of DNA repair factors on damaged chromosomes. *Nat Cell Biol*. 2010;12(1):80-6.

Besson A, Hwang HC, Cicero S, Donovan SL, Gurian-West M, Johnson D, Clurman BE, Dyer MA, Roberts JM. Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype. *Genes Dev*. 2007 Jul;21(14):1731-46.

Bétous R, Mason AC, Rambo RP, Bansbach CE, Badu-Nkansah A, Sirbu BM, Eichman BF, Cortez D. SMARCAL1 catalyzes fork regression and Holliday junction migration to maintain genome stability during DNA replication. *Genes Dev*. 2012 Jan;26(2):151-62.

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 2004 Nov;432(7015):332-337.

Bianco PR, Tracy RB, Kowalczykowski SC. DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison. *Front Biosci*. 1998 Jun;3:D570-603.

Bohr VA. Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance. *Trends Biochem Sci*. 2008 Dec;33(12):609-20.

Bouchard VJ, Rouleau M, Poirier GG. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp Hematol*. 2003 Jun;31(6):446-54.

Bouwman P, Aly A, Escandell JM, Pieterse M, Bartkova J, van der Gulden H, Hiddingh S, Thanasoula M, Kulkarni A, Yang Q, Haffty BG, Tommiska J, Blomqvist C, Drapkin R, Adams DJ, Nevanlinna H, Bartek J, Tarsounas M, Ganesan S, Jonkers J. 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Jun;17(6):688-95.

Bower JJ, Karaca GF, Zhou Y, Simpson DA, Cordeiro-Stone M, Kaufmann WK. Topoisomerase II α maintains genomic stability through decatenation G2 checkpoint signaling. *Oncogene*. 2010 Aug;29(34):4787-4799.

Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*. 2005 Apr;434(7035):913-7.

Bugreev DV, Hanaoka F, Mazin AV. Rad54 dissociates homologous recombination intermediates by branch migration. *Nat Struct Mol Biol.* 2007 Aug;14(8):746-53.

Bunting SF, Callén E, Wong N, Chen HT, Polato F, Gunn A, Bothmer A, Feldhahn N, Fernandez-Capetillo O, Cao L, Xu X, Deng CX, Finkel T, Nussenzweig M, Stark JM, Nussenzweig A. 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell.* 2010 Apr;141(2):243-54.

Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2001 Nov;276(45):42462-7.

Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell.* 2005 Feb;120(4):513-22.

Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2000 Feb;2(2):76-83.

Chan FK, Zhang J, Cheng L, Shapiro DN, Winoto A. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol.* 1995 May;15(5):2682-8.

Chandramouly G, Willis NA, Scully R. A protective role for BRCA2 at stalled replication forks. *Breast Cancer Res.* 2011 Sep;13(5):314.

Chen J, Feng W, Jiang J, Deng Y, Huen MS. Ring finger protein RNF169 antagonizes the ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *J Biol Chem.* 2012 Aug;287(33):27715-22.

Chen XB, Melchionna R, Denis CM, Gaillard PH, Blasina A, Van de Weyer I, Boddy MN, Russell P, Vialard J, McGowan CH. Human Mus81-associated endonuclease cleaves Holliday junctions in vitro. *Mol Cell.* 2001 Nov;8(5):1117-27.

Chen R, Subramanyam S, Elcock AH, Spies M, Wold MS. Dynamic binding of replication protein a is required for DNA repair. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jul;44(12):5758-5772.

Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res.* 2008 Oct;6(10):1521-33.

Chin L, Artandi SE, Shen Q, Tam A, Lee SL, Gottlieb GJ, Greider CW, DePinho RA. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell.* 1999 May;97(4):527-38.

Chiruvella KK, Liang Z, Wilson TE. Repair of Double-Strand Breaks by End Joining. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 May;5(5):a012757.

Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Aug;9(8):616-27.

Chiu J, Dawes IW. Redox control of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* 2012 Nov;22(11):592-601.

Cobb JA, Bjergbaek L, Shimada K, Frei C, Gasser SM. DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. *EMBO J.* 2003 Aug;22(16):4325-36.

Cobb JA, Schleker T, Rojas V, Bjergbaek L, Tercero JA, Gasser SM. Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations. *Genes Dev.* 2005 Dec;19(24):3055-69.

Collins NB, Wilson JB, Bush T, Thomashevski A, Roberts KJ, Jones NJ, Kupfer GM. ATR-dependent phosphorylation of FANCA on serine 1449 after DNA damage is important for FA pathway function. *Blood.* 2009 Mar;113(10):2181-90.

Cortez D, Glick G, Elledge SJ. Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul;101(27):10078-83.

Cousineau I, Belmaaza A. BRCA1 haploinsufficiency, but not heterozygosity for a BRCA1-truncating mutation, deregulates homologous recombination. *Cell Cycle.* 2007 Apr;6(8):962-71.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002 Jun;417(6892):949-54.

Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene.* 2010 Oct;29(41):5545-55.

Davis AJ, Chi L, So S, Lee KJ, Mori E, Fattah K, Yang J, Chen DJ. BRCA1 modulates the autophosphorylation status of DNA-PKcs in S phase of the cell cycle. *Nucleic Acids Res.* 2014 Oct;42(18):11487-501.

DeFazio LG, Stansel RM, Griffith JD, Chu G. Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J.* 2002 Jun;21(12):3192-200.

Difilippantonio S, Gapud E, Wong N, Huang CY, Mahowald G, Chen HT, Kruhlik MJ, Callen E, Livak F, Nussenzweig MC, Sleckman BP, Nussenzweig A. 53BP1 facilitates long-range DNA end-joining during V(D)J recombination. *Nature.* 2008 Nov;456(7221):529-33.

Dohrn L, Salles D, Siehler SY, Kaufmann J, Wiesmüller L. BRCA1-mediated repression of mutagenic end-joining of DNA double-strand breaks requires complex formation with BACH1. *Biochem J.* 2012 Feb;441(3):919-26.

Doil C, Mailand N, Bekker-Jensen S, Menard P, Larsen DH, Pepperkok R, Ellenberg J, Panier S, Durocher D, Bartek J, Lukas J, Lukas C. RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell.* 2009 Feb;136(3):435-46.

Fabbro M, Savage K, Hobson K, Deans AJ, Powell SN, McArthur GA, Khanna KK. BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage. *J Biol Chem.* 2004 Jul;279(30):31251-8.

Fan S, Ma YX, Wang C, Yuan RQ, Meng Q, Wang JA, Erdos M, Goldberg ID, Webb P, Kushner PJ, Pestell RG, Rosen EM. Role of direct interaction in BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity. *Oncogene.* 2001 Jan;20(1):77-87.

- Feng L, Li N, Li Y, Wang J, Gao M., Wang W, Chen J. Cell cycle-dependent inhibition of 53BP1 signaling by BRCA1. *Cell Discov.* 2015 Aug;1:15019.
- Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, Mortimer P, Swaisland H, Lau A, O'Connor MJ, Ashworth A, Carmichael J, Kaye SB, Schellens JH, de Bono JS. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med.* 2009 Jul;361(2):123-34.
- Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, Ashworth A, Jeggo P. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO J.* 2003 Jun;22(11):2860-71.
- Fu YP, Yu JC, Cheng TC, Lou MA, Hsu GC, Wu CY, Chen ST, Wu HS, Wu PE, Shen CY. Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the nonhomologous end-joining genes: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Res.* 2003 May;63(10):2440-6.
- Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, Bennett LM, Haugen-Strano A, Swensen J, Miki Y, Eddington K, McClure M, Frye C, Weaver-Feldhaus J, Ding W, Gholami Z, Sederkvist P, Terry L, Jhanwar S, Berchuck A. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science.* 1994 Oct;266(5182):120-2.
- Garbe JC, Bhattacharya S, Merchant B, Bassett E, Swisshelm K, Feiler HS, Wyrobek AJ, Stampfer MR. Molecular distinctions between stasis and telomere attrition senescence barriers shown by long-term culture of normal human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 2009 Oct;69(19):7557-68.
- Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell.* 2001 Feb;7(2):249-62.
- Gimbrone MA Jr, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med.* 1972 Aug;136(2):261-76.
- Goldstein M, Kastan MB. Repair versus Checkpoint Functions of BRCA1 Are Differentially Regulated by Site of Chromatin Binding. *Cancer Res.* 2015 Jul;75(13):2699-707.
- Goodrich DW, Wang NP, Qian YW, Lee EY, Lee WH. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell.* 1991 Oct;67(2):293-302.
- Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Dittullo RA Jr, Kastrinakis NG, Levy B, Kletsas D, Yoneta A, Herlyn M, Kittas C, Halazonetis TD. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature.* 2005 Apr;434(7035):907-13.
- Gottschalk AJ, Timinszky G, Kong SE, Jin J, Cai Y, Swanson SK, Washburn MP, Florens L, Ladurner AG, Conaway JW, Conaway RC. Poly(ADP-ribosylation) directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug;106(33):13770-4.
- Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson TE, Mann M, Lieber MR. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature.* 1997 Jul;388(6641):492-5.
- Grawunder U, Zimmer D, Lieber MR. DNA ligase IV binds to XRCC4 via a motif located between rather than within its BRCT domains. *Curr Biol.* 1998 Jul;8(15):873-6.

- Greenberg RA, Sobhian B, Pathania S, Cantor SB, Nakatani Y, Livingston DM. Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes Dev.* 2006 Jan;20(1):34-46.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010 Mar;140(6):883-99.
- Grundy GJ, Rulten SL, Zeng Z, Arribas-Bosacoma R, Iles N, Manley K, Oliver A, Caldecott KW. APLF promotes the assembly and activity of non-homologous end joining protein complexes. *EMBO J.* 2013 Jan;32(1):112-25.
- Gu J, Lu H, Tippin B, Shimazaki N, Goodman MF, Lieber MR. XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J.* 2007 Feb 21;26(4):1010-23. Epub 2007 Feb 8. Erratum in: *EMBO J.* 2007 Jul;26(14):3506-7.
- Gu J, Lu H, Tsai AG, Schwarz K, Lieber MR. Single-stranded DNA ligation and XLF-stimulated incompatible DNA end ligation by the XRCC4-DNA ligase IV complex: influence of terminal DNA sequence. *Nucleic Acids Res.* 2007 Aug;35(17):5755-62.
- Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y. Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev.* 1994 Dec;8(24):2939-52.
- Gunes C, Avila AI, Rudolph KL. Telomeres in cancer. *Differentiation.* 2017 Dec 21;99:41-50.
- Habraken Y, Verly WG. Further purification and characterization of the DNA 3'-phosphatase from rat-liver chromatin which is also a polynucleotide 5'-hydroxyl kinase. *Eur J Biochem.* 1988 Jan 15;171(1-2):59-66.
- Hakem R, de la Pompa JL, Elia A, Potter J, Mak TW. Partial rescue of Brca1 (5-6) early embryonic lethality by p53 or p21 null mutation. *Nat Genet.* 1997 Jul;16(3):298-302.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar;144(5):646-74.
- Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature.* 1994 Sep;371(6494):257-61.
- Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell.* 1999 Sep;98(6):859-69.
- Hartlerode AJ, Scully R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem J.* 2009 Sep;423(2):157-68. Erratum in: *Biochem J.* 2010 Mar;426(3):389.
- Hartman AR, Ford JM. BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nat Genet.* 2002 Sep;32(1):180-4.
- Hashimoto Y, Puddu F, Costanzo V. RAD51- and MRE11-dependent reassembly of uncoupled CMG helicase complex at collapsed replication forks. *Nat Struct Mol Biol.* 2011 Dec;19(1):17-24.
- Helleday T, Bryant HE, Schultz N. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) in homologous recombination and as a target for cancer therapy. *Cell Cycle.* 2005 Sep;4(9):1176-8.

Hentges P, Ahnesorg P, Pitcher RS, Bruce CK, Kysela B, Green AJ, Bianchi J, Wilson TE, Jackson SP, Doherty AJ. Evolutionary and functional conservation of the DNA non-homologous end-joining protein, XLF/Cernunnos. *J Biol Chem*. 2006 Dec;281(49):37517-26.

Hohegger H, Takeda S, Hunt T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Nov;9(11):910-6.

Hopfner KP, Craig L, Moncalian G, Zinkel RA, Usui T, Owen BA, Karcher A, Henderson B, Bodmer JL, McMurray CT, Carney JP, Petrini JH, Tainer JA. The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature*. 2002 Aug;418(6897):562-6.

Huen MS, Grant R, Manke I, Minn K, Yu X, Yaffe MB, Chen J. RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell*. 2007 Nov;131(5):901-14.

Iglehart JD, Silver DP. Synthetic lethality--a new direction in cancer-drug development. *N Engl J Med*. 2009 Jul;361(2):189-91.

Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jun;1807(6):735-45.

Jiang W, Crowe JL, Liu X, Nakajima S, Wang Y, Li C, Lee BJ, Dubois RL, Liu C, Yu X, Lan L, Zha S. Differential phosphorylation of DNA-PKcs regulates the interplay between end-processing and end-ligation during non-homologous end-joining. *Molecular cell*. 2015 Apr;58(1):172-185.

Jiang G, Plo I, Wang T, Rahman M, Cho JH, Yang E, Lopez BS, Xia F. BRCA1-Ku80 protein interaction enhances end-joining fidelity of chromosomal double-strand breaks in the G1 phase of the cell cycle. *J Biol Chem*. 2013 Mar;288(13):8966-76.

Johnson RD, Jasin M. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J*. 2000 Jul;19(13):3398-3407.

Joukov V, Groen AC, Prokhorova T, Gerson R, White E, Rodriguez A, Walter JC, Livingston DM. The BRCA1/BARD1 heterodimer modulates ran-dependent mitotic spindle assembly. *Cell*. 2006 Nov;127(3):539-52.

Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):239-52.

Kais Z, Barsky SH, Mathsyaraja H, Zha A, Ransburgh DJ, He G, Pilarski RT, Shapiro CL, Huang K, Parvin JD. KIAA0101 interacts with BRCA1 and regulates centrosome number. *Mol Cancer Res*. 2011 Aug;9(8):1091-9.

Kalb R, Mallery DL, Larkin C, Huang J TJ, Hiom K. BRCA1 Is a Histone-H2A-Specific Ubiquitin Ligase. *Cell Rep*. 2014 Aug;8(4):999-1005.

Kanno S, Kuzuoka H, Sasao S, Hong Z, Lan L, Nakajima S, Yasui A. A novel human AP endonuclease with conserved zinc-finger-like motifs involved in DNA strand break responses. *EMBO J*. 2007 Apr;26(8):2094-103.

Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 2004 Nov;432(7015):316-23.

Kazerounian S, Lawler J. Integration of pro- and anti-angiogenic signals by endothelial cells. *J Cell Commun Signal*. 2018 Mar;12(1):171-179.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994 Dec;266(5193):2011-5.

Kong X, Ball AR Jr, Pham HX, Zeng W, Chen HY, Schmiesing JA, Kim JS, Berns M, Yokomori K. Distinct functions of human cohesin-SA1 and cohesin-SA2 in double-strand break repair. *Mol Cell Biol*. 2014 Feb;34(4):685-98.

Konishi H, Mohseni M, Tamaki A, Garay JP, Croessmann S, Karnan S, Ota A, Wong HY, Konishi Y, Karakas B, Tahir K, Abukhdeir AM, Gustin JP, Cidado J, Wang GM, Cosgrove D, Cochran R, Jelovac D, Higgins MJ, Arena S, Hawkins L, Lauring J, Gross AL, Heaphy CM, Hosokawa Y, Gabrielson E, Meeker AK, Visvanathan K, Argani P, Bachman KE, Park BH. Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene BRCA1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct;108(43):17773-8.

Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer*. 2005 Oct;5(10):773-85.

Kruhlak MJ, Celeste A, Dellaire G, Fernandez-Capetillo O, Müller WG, McNally JG, Bazett-Jones DP, Nussenzweig A. Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*. 2006 Mar;172(6):823-34.

Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug;89(16):7491-5.

Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. 2010 Nov;24(22):2463-79.

Lazzerini-Denchi E, Sfeir A. Stop pulling my strings - what telomeres taught us about the DNA damage response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Jun;17(6):364-78.

Lee JH, Paull TT. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*. 2005 Apr 22;308(5721):551-4. Erratum in: *Science*. 2005 Jun;308(5730):1870.

Lee MH, Reynisdóttir I, Massagué J. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev*. 1995 Mar;9(6):639-49.

Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*. 2010 Jun;79:181-211.

Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH Jr, Pestell RG, Kushner PJ. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem* 2002 Jun;277: 24353-60.

Liu T, Ghosal G, Yuan J, Chen J, Huang J. FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA interstrand cross-link repair. *Science*. 2010 Aug;329(5992):693-6.

Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA, Elledge SJ. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev*. 2000 Jun;14(12):1448-59.

Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death--I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. *J Insect Physiol*. 1965 Feb;11:123-33.

Long DT, Räschle M, Joukov V, Walter JC. Mechanism of RAD51-dependent DNA interstrand cross-link repair. *Science*. 2011 Jul;333(6038):84-7.

Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, Manis JP, van Deursen J, Nussenzweig A, Paull TT, Alt FW, Chen J. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell*. 2006 Jan;21(2):187-200.

Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2004 Nov;432(7015):307-15.

Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol*. 1998 Feb;18(2):753-61.

Luo Y, Li J, Liu Y, Lin L, Du Y, Li S, Yang H, Vajta G, Callesen H, Bolund L, Sørensen CB. High efficiency of BRCA1 knockout using rAAV-mediated gene targeting: developing a pig model for breast cancer. *Transgenic Res*. 2011 Oct;20(5):975-88.

Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*. 2002 Mar;108(6):781-94.

Ma Y, Schwarz K, Lieber MR. The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *DNA Repair (Amst)*. 2005 Jul;4(7):845-51.

Mailand N, Bekker-Jensen S, Fastrup H, Melander F, Bartek J, Lukas C, Lukas J. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell*. 2007 Nov;131(5):887-900.

Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci*. 2005 Nov;30(11):630-41.

Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009 Mar;9(3):153-66.

Manke IA, Lowery DM, Nguyen A, Yaffe MB. BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science*. 2003 Oct;302(5645):636-9.

Maréchal A, Zou L. DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harb Perspect in Biol*. 2013 Sep;5(9):a012716.

Margarit SM, Sondermann H, Hall BE, Nagar B, Hoelz A, Pirruccello M, Bar-Sagi D, Kuriyan J. Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. *Cell*. 2003 Mar;112(5):685-95.

Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 2007 May;316(5828):1160-6.

McIlwraith MJ, Vaisman A, Liu Y, Fanning E, Woodgate R, West SC. Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Mol Cell*. 2005 Dec 9;20(5):783-92. Erratum in: *Mol Cell*. 2006 Feb;21(3):445.

Meetei AR, Medhurst AL, Ling C, Xue Y, Singh TR, Bier P, Steltenpool J, Stone S, Dokal I, Mathew CG, Hoatlin M, Joenje H, de Winter JP, Wang W. A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet*. 2005 Sep;37(9):958-63.

Merajver SD, Frank TS, Xu J, Pham TM, Calzone KA, Bennett-Baker P, Chamberlain J, Boyd J, Garber JE, Collins FS, Weber BL. Germline BRCA1 mutations and loss of the wild-type allele in tumors from families with early onset breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 1995 May;1(5):539-44.

Mérel P, Prieur A, Pfeiffer P, Delattre O. Absence of major defects in non-homologous DNA end joining in human breast cancer cell lines. *Oncogene.* 2002 Aug;21(36):5654-9.

Meyerson M, Harlow E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol.* 1994 Mar;14(3):2077-86.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, Tran T, McClure M, Frye C, Hattier T, Phelps R, Haugen-Strano A, Katcher H, Yakumo K, Gholami Z, Shaffer D, Stone S, Bayer S, Wray C, Bogden R, Dayananth P, Ward J, Tonin P, Narod S, Bristow PK, Norris FH, Helvering L, Morrison P., Rosteck P, Lai M, Barrett JC, Lewis C, Neuhausen S, Cannon-Albright L, Goldgar D, Wiseman R, Kamb A, Skolnick MH. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science.* 1994 Oct;266(5182):66-71.

Modesti M, Hesse JE, Gellert M. DNA binding of Xrcc4 protein is associated with V(D)J recombination but not with stimulation of DNA ligase IV activity. *The EMBO J.* 1999 Apr;18(7):2008-2018.

Monteiro AN, August A, Hanafusa H. Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov;93(24):13595-9.

Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M. Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell.* 1999 Oct;4(4):511-8.

Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 May;8(5):379-93.

Neuhausen SL, Marshall CJ. Loss of heterozygosity in familial tumors from three BRCA1-linked kindreds. *Cancer Res.* 1994 Dec;54(23):6069-72.

Nick McElhinny SA, Snowden CM, McCarville J, Ramsden DA. Ku Recruits the XRCC4-Ligase IV Complex to DNA Ends. *Molecular and Cellular Biology.* 2000 May;20(9):2996-3003.

Nicol CJ, Harrison ML, Laposa RR, Gimelshtein IL, Wells PG. A teratologic suppressor role for p53 in benzo[a]pyrene-treated transgenic p53-deficient mice. *Nat Genet.* 1995 Jun;10(2):181-7.

Nielsen FC, van Overeem Hansen T, Sørensen CS. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. *Nat Rev Cancer.* 2016 Sep;16(9):599-612.

Niessen K, Fu Y, Chang L, Hoodless PA, McFadden D, Karsan A. Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *J Cell Biol.* 2008 Jul;182(2):315-25.

Nimonkar AV, Genschel J, Kinoshita E, Polaczek P, Campbell JL, Wyman C, Modrich P, Kowalczykowski SC. BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev.* 2011 Feb;25(4):350-62.

O'Connell MJ, Raleigh JM, Verkade HM, Nurse P. Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J.* 1997 Feb;16(3):545-54.

Oikawa A, Tohda H, Kanai M, Miwa M, Sugimura T. Inhibitors of poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase induce sister chromatid exchanges. *Biochem Biophys Res Commun*. 1980 Dec;97(4):1311-6.

Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D, Frese KK, Denicola G, Feig C, Combs C, Winter SP, Ireland-Zecchini H, Reichelt S, Howat WJ, Chang A, Dhara M, Wang L, Rückert F, Grützmann R, Pilarsky C, Izeradjene K, Hingorani SR, Huang P, Davies SE, Plunkett W, Egorin M, Hruban RH, Whitebread N, McGovern K, Adams J, Iacobuzio-Donahue C, Griffiths J, Tuveson DA. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*. 2009 Jun;324(5933):1457-61.

O'Neil NJ, Bailey ML, Hieter P. Synthetic lethality and cancer. *Nat Rev Genet*. 2017 Oct;18(10):613-23.

Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Jan;15(1):7-18.

Panier S, Durocher D. Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*. 2009 Apr;8(4):436-43.

Parvin JD. The BRCA1-dependent ubiquitin ligase, gamma-tubulin, and centrosomes. *Environ Mol Mutagen*. 2009 Oct;50(8):649-53.

Pathania S, Bade S, Le Guillou M, Burke K, Reed R, Bowman-Colin C, Su Y, Ting DT, Polyak K, Richardson AL, Feunteun J, Garber JE, Livingston DM. BRCA1 haploinsufficiency for replication stress suppression in primary cells. *Nat Commun*. 2014 Nov;5:5496.

Pathania S, Nguyen J, Hill SJ, Scully R, Adelmant GO, Marto JA, Feunteun J, Livingston DM. BRCA1 is required for postreplication repair after UV-induced DNA damage. *Mol Cell*. 2011 Oct;44(2):235-51.

Paull TT, Cortez D, Bowers B, Elledge SJ, Gellert M. Direct DNA binding by Brca1. *Proc of the Natl Acad Sci U S A*. 2001 May;98(11):6086-91.

Paulsen RD, Cimprich KA. The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair (Amst)*. 2007 Jul;6(7):953-66.

Pellegrini L, Yu DS, Lo T, Anand S, Lee M, Blundell TL, Venkitaraman AR. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature*. 2002 Nov;420(6913):287-93.

Petermann E, Orta ML, Issaeva N, Schultz N, Helleday T. Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol Cell*. 2010 Feb;37(4):492-502.

Pichierri P, Rosselli F, Franchitto A. Werner's syndrome protein is phosphorylated in an ATR/ATM-dependent manner following replication arrest and DNA damage induced during the S phase of the cell cycle. *Oncogene*. 2003 Mar;22(10):1491-500.

Poulsen M, Lukas C, Lukas J, Bekker-Jensen S, Mailand N. Human RNF169 is a negative regulator of the ubiquitin-dependent response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*. 2012 Apr;197(2):189-99.

Proia TA, Keller PJ, Gupta PB, Klebba I, Jones AD, Sedic M, Gilmore H, Tung N, Naber SP, Schnitt S, Lander ES, Kuperwasser C. Genetic predisposition directs breast cancer phenotype by dictating progenitor cell fate. *Cell Stem Cell*. 2011 Feb;8(2):149-63.

Raynaud CM, Hernandez J, Llorca FP, Nuciforo P, Mathieu MC, Commo F, Delalogue S, Sabatier L, André F, Soria JC. DNA damage repair and telomere length in normal breast, preneoplastic lesions, and invasive cancer. *Am J Clin Oncol*. 2010 Aug;33(4):341-5.

Reid LJ, Shakya R, Modi AP, Lokshin M, Cheng JT, Jasin M, Baer R, Ludwig T. E3 ligase activity of BRCA1 is not essential for mammalian cell viability or homology-directed repair of double-strand DNA breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec;105(52):20876-81.

Rhind N, Furnari B, Russell P. Cdc2 tyrosine phosphorylation is required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Genes Dev*. 1997 Feb;11(4):504-11.

Richardson C, Moynahan ME, Jasin M. Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations. *Genes Dev*. 1998 Dec;12(24):3831-42.

Rodríguez JA, Henderson BR. Identification of a functional nuclear export sequence in BRCA1. *J Biol Chem*. 2000 Dec;275(49):38589-96.

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 1998 Mar;273(10):5858-68.

Rosen EM. BRCA1 in the DNA damage response and at telomeres. *Front Genet*. 2013 Jun;4:85.

Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, van der Burg E, Nygren AO, Zander SA, Derksen PW, de Bruin M, Zevenhoven J, Lau A, Boulter R, Cranston A, O'Connor MJ, Martin NM, Borst P, Jonkers J. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Nov;105(44):17079-84.

Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer*. 2011 Dec;12(1):68-78.

Rulten SL, Cortes-Ledesma F, Guo L, Iles NJ, Caldecott KW. APLF (C2orf13) is a novel component of poly(ADP-ribose) signaling in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 2008 Jul;28(14):4620-8. doi: 10.1128/MCB.02243-07. Epub 2008 May 12. Erratum in: *Mol Cell Biol*. 2008 Dec;28(23):7261.

Saha J, Davis AJ. Unsolved mystery: the role of BRCA1 in DNA end-joining. *J Radiat Res*. 2016 Aug;57.

Sakai W, Swisher EM, Karlan BY, Agarwal MK, Higgins J, Friedman C, Villegas E, Jacquemont C, Farrugia DJ, Couch FJ, Urban N, Taniguchi T. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature*. 2008 Feb;451(7182):1116-20.

Santamaría D, Barrière C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K, Cáceres JF, Dubus P, Malumbres M, Barbacid M. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*. 2007 Aug;448(7155):811-5.

Santamaria PG, Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. EMT: Present and future in clinical oncology. *Mol Oncol*. 2017 Jul;11(7):718-738.

Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*. 2007 Nov;450(7169):509-14.

Sato K, Sundaramoorthy E, Rajendra E, Hattori H, Jeyasekharan AD, Ayoub N, Schiess R, Aebbersold R, Nishikawa H, Sedukhina AS, Wada H, Ohta T, Venkitaraman AR. A DNA-damage selective role for BRCA1 E3 ligase in claspin ubiquitylation, CHK1 activation, and DNA repair. *Curr Biol.* 2012 Sep;22(18):1659-66.

Satoh MS, Lindahl T. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature.* 1992 Mar;356(6367):356-8.

Savic V, Yin B, Maas NL, Bredemeyer AL, Carpenter AC, Helmink BA, Yang-Iott KS, Sleckman BP, Bassing CH. Formation of dynamic gamma-H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin. *Mol Cell.* 2009 May;34(3):298-310.

Schlacher K, Christ N, Siaud N, Egashira A, Wu H, Jasin M. Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell.* 2011 May;145(4):529-42.

Schlegel BP, Jodelka FM, Nunez R. BRCA1 promotes induction of ssDNA by ionizing radiation. *Cancer Res.* 2006 May;66(10):5181-9.

Schosserer M, Grillari J, Breitenbach M. The Dual Role of Cellular Senescence in Developing Tumors and Their Response to Cancer Therapy. *Front Oncol.* 2017 Nov;7:278.

Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol.* 2000 Dec;151(7):1381-90.

Schwertman P, Bekker-Jensen S, Mailand N. Regulation of DNA double-strand break repair by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016 May;17(6):379-94.

Scully R, Chen J, Ochs RL, Keegan K, Hoekstra M, Feunteun J, Livingston DM. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell.* 1997b Aug;90(3):425-35.

Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell.* 1997a Jan;88(2):265-75.

Scully R, Ganesan S, Brown M, De Caprio JA, Cannistra SA, Feunteun J, Schnitt S, Livingston DM. Location of BRCA1 in human breast and ovarian cancer cells. *Science.* 1996 Apr 5;272(5258):123-6.

Scully R, Ganesan S, Vlasakova K, Chen J, Socolovsky M, Livingston DM. Genetic analysis of BRCA1 function in a defined tumor cell line. *Mol Cell.* 1999 Dec;4(6):1093-9.

Sedic M, Skibinski A, Brown N, Gallardo M, Mulligan P, Martinez P, Keller PJ, Glover E, Richardson AL, Cowan J, Toland AE, Ravichandran K, Riethman H, Naber SP, Näär AM, Blasco MA, Hinds PW, Kuperwasser C. Haploinsufficiency for BRCA1 leads to cell-type-specific genomic instability and premature senescence. *Nat Commun.* 2015 Jun;6:7505.

Seifert FU, Lammens K, Stoehr G, Kessler B, Hopfner KP. Structural mechanism of ATP-dependent DNA binding and DNA end bridging by eukaryotic Rad50. *EMBO J.* 2016 Apr;35(7):759-72.

Seluanov A, Hine C, Azpurua J, Feigensohn M, Bozzella M, Mao Z, Catania KC, Gorbunova V. Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Nov;106(46):19352-7.

- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993 Dec;366(6456):704-7.
- Shamanna RA, Lu H, de Freitas JK, Tian J, Croteau DL, Bohr VA. WRN regulates pathway choice between classical and alternative non-homologous end joining. *Nat Commun*. 2016 Dec;7:13785.
- Shechter D, Costanzo V, Gautier J. Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA Repair (Amst)*. 2004 Aug-Sep;3(8-9):901-8.
- Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell*. 1993 Jun;73(6):1059-65.
- Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999 Jun;13(12):1501-12.
- Shiloh Y, Kastan MB. ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv Cancer Res*. 2001 Oct;83:209-54.
- Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*. 2003 Mar;3(3):155-68.
- Simbulan-Rosenthal CM, Haddad BR, Rosenthal DS, Weaver Z, Coleman A, Luo R, Young HM, Wang ZQ, Ried T, Smulson ME. Chromosomal aberrations in PARP(-/-) mice: genome stabilization in immortalized cells by reintroduction of poly(ADP-ribose) polymerase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov;96(23):13191-6.
- Sirbu BM, Cortez D. DNA damage response: three levels of DNA repair regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Aug;5(8):a012724.
- Smogorzewska A, Desetty R, Saito TT, Schlabach M, Lach FP, Sowa ME, Clark AB, Kunkel TA, Harper JW, Colaiácovo MP, Elledge SJ. A genetic screen identifies FAN1, a Fanconi anemia-associated nuclease necessary for DNA interstrand crosslink repair. *Mol Cell*. 2010 Jul;39(1):36-47.
- Sobeck A, Stone S, Landais I, de Graaf B, Hoatlin ME. The Fanconi anemia protein FANCM is controlled by FANCD2 and the ATR/ATM pathways. *J Biol Chem*. 2009 Sep;284(38):25560-8.
- Sobhian B, Shao G, Lilli DR, Culhane AC, Moreau LA, Xia B, Livingston DM, Greenberg RA. RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science*. 2007 May;316(5828):1198-202.
- Sogo JM, Lopes M, Foiani M. Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science*. 2002 Jul;297(5581):599-602.
- Svendsen JM, Smogorzewska A, Sowa ME, O'Connell BC, Gygi SP, Elledge SJ, Harper JW. Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. *Cell*. 2009 Jul;138(1):63-77.
- Swisher EM, Sakai W, Karlan BY, Wurz K, Urban N, Taniguchi T. Secondary BRCA1 mutations in BRCA1-mutated ovarian carcinomas with platinum resistance. *Cancer Res*. 2008 Apr;68(8):2581-6.
- Sy SM, Huen MS, Chen J. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr;106(17):7155-60.
- Tassone P, Di Martino MT, Ventura M, Pietragalla A, Cucinotto I, Calimeri T, Bulotta A, Neri P, Caraglia M, Tagliaferri P. Loss of BRCA1 function increases the antitumor activity of cisplatin against human breast cancer xenografts in vivo. *Cancer Biol Ther*. 2009 Apr;8(7):648-53.

Taylor SS, McKeon F. Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell*. 1997 May;89(5):727-35.

Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*. 1994 Jul;78(1):67-74.

Trenz K, Smith E, Smith S, Costanzo V. ATM and ATR promote Mre11 dependent restart of collapsed replication forks and prevent accumulation of DNA breaks. *EMBO J*. 2006 Apr;25(8):1764-74.

Tu Z, Aird KM, Bitler BG, Nicodemus JP, Beeharry N, Xia B, Yen TJ, Zhang R. Oncogenic RAS regulates BRIP1 expression to induce dissociation of BRCA1 from chromatin, inhibit DNA repair, and promote senescence. *Dev Cell*. 2011 Dec;21(6):1077-91.

Tu Z, Zhuang X, Yao YG, Zhang R. BRG1 is required for formation of senescence-associated heterochromatin foci induced by oncogenic RAS or BRCA1 loss. *Mol Cell Biol*. 2013 May;33(9):1819-29.

Tulin A, Spradling A. Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* puff loci. *Science*. 2003 Jan;299(5606):560-2.

Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, Friedlander M, Arun B, Loman N, Schmutzler RK, Wardley A, Mitchell G, Earl H, Wickens M, Carmichael J. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*. 2010 Jul;376(9737):235-44.

Vulliamy TJ, Marrone A, Knight SW, Walne A, Mason PJ, Dokal I. Mutations in dyskeratosis congenita: their impact on telomere length and the diversity of clinical presentation. *Blood*. 2006 Apr;107(7):2680-5.

Wahl GM, Carr AM. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat Cell Biol*. 2001 Dec;3(12):E277-86. Erratum in: *Nat Cell Biol* 2002 Apr;4(4):328.

Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*. 2001 Aug;412(6847):607-14.

Wang B, Matsuoka S, Carpenter PB, Elledge SJ. 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science*. 2002 Nov;298(5597):1435-8.

Wang ZQ, Stingl L, Morrison C, Jantsch M, Los M, Schulze-Osthoff K, Wagner EF. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev*. 1997 Sep;11(18):2347-58.

Wang H, Yu X, Su C, Shi Y, Zhao L. Chitosan nanoparticles triggered the induction of ROS-mediated cytoprotective autophagy in cancer cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018 Jan;9:1-9.

Weinert TA, Hartwell LH. The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 1988 Jul;241(4863):317-22.

Wernersson R, Schierup MH, Jørgensen FG, Gorodkin J, Panitz F, Staerfeldt HH, Christensen OF, Mailund T, Hornshøj H, Klein A, Wang J, Liu B, Hu S, Dong W, Li W, Wong GK, Yu J, Wang J, Bendixen C, Fredholm M, Brunak S, Yang H, Bolund L. Pigs in sequence space: a 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing. *BMC Genomics*. 2005 May;6:70.

West SC. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jun;4(6):435-45.

Williams RS, Glover JN. Structural consequences of a cancer-causing BRCA1-BRCT missense mutation. *J Biol Chem*. 2003 Jan;278(4):2630-5.

- Wilson JB, Yamamoto K, Marriott AS, Hussain S, Sung P, Hoatlin ME, Mathew CG, Takata M, Thompson LH, Kupfer GM, Jones NJ. FANCG promotes formation of a newly identified protein complex containing BRCA2, FANCD2 and XRCC3. *Oncogene*. 2008 Jun;27(26):3641-52.
- Wong AK, Ormonde PA, Pero R, Chen Y, Lian L, Salada G, Berry S, Lawrence Q, Dayananth P, Ha P, Tavtigian SV, Teng DH, Bartel PL. Characterization of a carboxy-terminal BRCA1 interacting protein. *Oncogene*. 1998 Nov;17(18):2279-85.
- Wu L, Hickson ID. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*. 2003 Dec;426(6968):870-4.
- Wu J, Huen MS, Lu LY, Ye L, Dou Y, Ljungman M, Chen J, Yu X. Histone ubiquitination associates with BRCA1-dependent DNA damage response. *Mol Cell Biol*. 2009 Feb;29(3):849-60.
- Wu J, Lu LY, Yu X. The role of BRCA1 in DNA damage response. *Protein Cell*. 2010 Feb;1(2):117-23.
- Wu Q, Ochi T, Matak-Vinkovic D, Robinson CV, Chirgadze DY, Blundell TL. Non-homologous end-joining partners in a helical dance: structural studies of XLF-XRCC4 interactions. *Biochem Soc Trans*. 2011 Oct;39(5):1387-92.
- Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, Yang MC, Hwang LY, Bowcock AM, Baer R. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet*. 1996 Dec;14(4):430-40.
- Xia Y, Pao GM, Chen HW, Verma IM, Hunter T. Enhancement of BRCA1 E3 ubiquitin ligase activity through direct interaction with the BARD1 protein. *J Biol Chem*. 2003 Feb;278(7):5255-63.
- Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, Liu X, Jasin M, Couch FJ, Livingston DM. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell*. 2006 Jun;22(6):719-29.
- Xing M, Yang M, Huo W, Feng F, Wei L, Jiang W, Ning S, Yan Z, Li W, Wang Q, Hou M, Dong C, Guo R, Gao G, Ji J, Zha S, Lan L, Liang H, Xu D. Interactome analysis identifies a new paralogue of XRCC4 in non-homologous end joining DNA repair pathway. *Nat Commun*. 2015 Feb;6:6233.
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*. 1993 Dec;366(6456):701-4.
- Xu B, Kim St, Kastan MB. Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol*. 2001 May;21(10):3445-50.
- Xu B, O'Donnell AH, Kim ST, Kastan MB. Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer Res*. 2002 Aug;62(16):4588-91.
- Yaneva M, Kowalewski T, Lieber MR. Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *The EMBO J*. 1997 Aug;16(16):5098-5112.
- Yang K, Guo R, Xu D. Non-homologous end joining: advances and frontiers. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2016 Jul;48(7):632-40.
- Yang H, Li Q, Fan J, Holloman WK, Pavletich NP. The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction. *Nature*. 2005 Feb;433(7026):653-7.

- Yeo JE, Lee EH, Hendrickson EA, Sobeck A. CtIP mediates replication fork recovery in a FANCD2-regulated manner. *Hum Mol Genet.* 2014 Jul;23(14):3695-705.
- Yoo S, Dynan WS. Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res.* 1999 Dec;27(24):4679-86.
- Yu X, Chen J. DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Mol Cell Biol.* 2004 Nov;24(21):9478-86.
- Yu X, Wu LC, Bowcock AM, Aronheim A, Baer R. The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact in vivo with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. *J Biol Chem.* 1998 Sep;273(39):25388-92.
- Yusufzai T, Kadonaga JT. HARP is an ATP-driven annealing helicase. *Science.* 2008 Oct;322(5902):748-50.
- Zhang F, Ma J, Wu J, Ye L, Cai H, Xia B, Yu X. PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr Biol.* 2009 Mar;19(6):524-9.
- Zhang J, Willers H, Feng Z, Ghosh JC, Kim S, Weaver DT, Chung JH, Powell SN, Xia F. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* 2004 Jan;24(2):708-18.
- Zhao GY, Sonoda E, Barber LJ, Oka H, Murakawa Y, Yamada K, Ikura T, Wang X, Kobayashi M, Yamamoto K, Boulton SJ, Takeda S. A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination. *Mol Cell.* 2007 Mar;25(5):663-75.
- Zhao H, Watkins JL, Piwnica-Worms H. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov;99(23):14795-800.
- Zhao X, Wei C, Li J, Xing P, Li J, Zheng S, Chen X. Cell cycle-dependent control of homologous recombination. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2017 Aug;49(8):655-668.
- Zhong Q, Boyer TG, Chen PL, Lee WH. Deficient nonhomologous end-joining activity in cell-free extracts from Brca1-null fibroblasts. *Cancer Res.* 2002 Jul;62(14):3966-70.
- Zhong Q, Chen CF, Li S, Chen Y, Wang CC, Xiao J, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science.* 1999 Jul;285(5428):747-50.
- Zhu Q, Pao GM, Huynh AM, Suh H, Tonnu N, Nederlof PM, Gage FH, Verma IM. BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. *Nature.* 2011 Sep;477(7363):179-84.