

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2014**

**Zuzana Loubalová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Alternativní spojování nehomologických konců**

Bakalářská práce

**Zuzana Loubalová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2014**

**Vedoucí práce: Mgr. Juraj Kramara, Ph.D.**

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Podpis.....

## Souhrn

Neschopnost buněk opravit poškozenou DNA vede ke genetické nestabilitě, která se významnou měrou podílí na vzniku a progresu nádorových onemocnění. Velmi závažným poškozením DNA jsou dvouvláknové zlomy, které mohou vést ke genomovým přestavbám, a ty se běžně vyskytují v rakovinných buňkách. V průběhu evoluce se u živých organismů vyvinuly účinné opravné dráhy DNA, které jsou v současnosti intenzivně zkoumány. Mezi nimi jsou i dráhy, které odstraňují dvouvláknové zlomy, a tím zajišťují stabilitu genomu a viabilitu buněk. Tuto opravu vykonává homologní rekombinace, využívající templáty sesterských chromatid. V buňkách savců je však oprava zprostředkována především spojováním nehomologických konců, kde není vyžadována přítomnost homologie. Při některých specifických buněčných dějích a při absenci kanonických faktorů spojování nehomologických konců se uplatňuje alternativní dráha spojování nehomologických konců. Toto je u lidí běžný opravný mechanismus, u kterého ovšem dochází k častým chybám, což může vést k rozvoji nádorového bujení. Opravnou dráhu je však možné, díky inhibici enzymu PARP1, manipulovat v léčbě rakoviny.

## Summary

Compromised DNA repair leads to genetic instability, which is known to fuel development and progression of cancer. Double strand breaks represent an extremely toxic DNA lesion that may cause profound genomic rearrangements commonly found in cancer cells. In the course of evolution the living organisms have developed a set of efficient DNA repair pathways that have been investigated intensively. Among them, there are pathways that eliminate double strand breaks, thereby ensuring genomic stability and cell viability. The repair of double strand breaks is mostly performed by the homologous recombination pathway, using sister chromatid templates. In mammalian cells, however, repair is primarily mediated by non-homologous end joining that does not require the presence of homologous template. In some specific processes and in the absence of the canonical non-homologous end joining factors double strand break repair is mediated by alternative non-homologous end joining. It is a common repair mechanism in human cells that, however, leads to frequent errors, which may lead to the development of the tumor. This repair pathway can be manipulated in the treatment of cancer via PARP1 inhibition.

Tímto chci vyjádřit velké poděkování vedoucímu bakalářské práce Mgr. Juraji Kramarovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup a poskytnutí cenných rad. Dále chci poděkovat Mgr. Jánovi Gurskému, Ph.D. za přínosné nápady a pomoc při práci. V neposlední řadě poděkování patří celému týmu Laboratoře genomové integrity na Ústavu Molekulární a Translační Medicíny Univerzity Palackého v Olomouci za umožnění zpracování mé bakalářské práce.

# Obsah

1	Úvod.....	9
2	Současný stav řešené problematiky.....	11
2.1	Dvouvláknové zlomy .....	11
2.1.1	Signalizace DDR.....	11
2.1.2	Opravné mechanismy DSBs.....	13
2.1.2.1	Volba opravné dráhy .....	13
2.2	Homologní rekombinace .....	14
2.2.1	Náležitosti HR.....	14
2.2.2	Proces HR .....	15
2.2.3	<i>Single strand annealing</i> .....	17
2.3	Spojování nehomologických konců DNA.....	18
2.3.1	Klíčové komponenty NHEJ .....	18
2.3.1.1	Protein Ku .....	18
2.3.1.2	DNA-PKcs a Artemis.....	19
2.3.1.3	Polymerázová X rodina .....	20
2.3.1.4	XLJ, XRCC4 a DNA Ligáza IV .....	20
2.3.2	Proces NHEJ .....	21
2.3.3	V(D)J a <i>class switch</i> rekombinace .....	22
2.4	Alternativní spojování nehomologických konců .....	23
2.4.1	Enzymatická základna aNHEJ.....	24
2.4.1.1	PARP1 v aNHEJ .....	25
2.4.1.2	Resekční enzymy.....	26
2.4.1.3	Polymeráza $\lambda$ a PNK.....	26
2.4.1.4	Ligáza I/III a XRCC1 .....	26
2.4.2	Regulace aNHEJ .....	27
2.4.3	aNHEJ a telomerické fúze .....	28
2.4.4	aNHEJ a chromozomální translokace.....	28
2.4.5	aNHEJ v imunitním systému .....	29
2.4.6	Role aNHEJ v nádorovém bujení.....	30
2.4.7	Reportéry pro měření NHEJ a aNHEJ .....	30
2.5	PARP1 .....	32
2.5.1	PARP inhibitory.....	33

2.5.1.1	Syntetická letalita .....	33
3	Cíl práce.....	34
4	Materiál a metody.....	35
4.1	Materiál .....	35
4.1.1	Pomůcky a přístrojové vybavení .....	35
4.1.2	Chemikálie a roztoky .....	35
4.1.3	Buněčné linie .....	35
4.1.4	Plazmidy .....	35
4.2	Metody .....	37
4.2.1	Kultivace a pasážování linií.....	37
4.2.2	Rozmražení a zamražení buněk.....	38
4.2.3	Počítání hustoty buněčné suspenze .....	38
4.2.4	Transfekce buněčných linií .....	38
4.2.5	Tvorba stabilní linie s reportérem EJ2 elektroporací.....	39
4.2.6	Sběr kolonií reportérových linií.....	39
4.2.7	siRNA transfekce .....	39
4.2.8	Měření na průtokovém cytometru .....	40
5	Výsledky.....	41
5.1	Detekce aNHEJ v reportérové linii U2OS-EJ2.....	41
5.2	Detekce opravy aNHEJ a její ovlivnění inhibicí enzymu PARP1 v reportérové linii HEK293T-EJ2.....	43
5.3	Detekce opravy NHEJ a její ovlivnění inhibicí enzymu PARP1 v reportérové linii HEK293T-EJ5.....	46
5.4	Zastoupení aNHEJ v celkovém NHEJ u linie HEK293T .....	50
6	Diskuze .....	52
7	Závěr.....	55
8	Literatura .....	56
9	Seznam použitých zkratk a symbolů .....	63



# 1 Úvod

Buňky živých organismů jsou neustále vystavovány faktorům, které poškozují esenciální buněčné struktury a biomakromolekuly. K nejzávažnějším patří poškození DNA způsobené dvouvláknovými zlomy (DSBs, *double strand break(s)*), kdy dochází ke vzniku mutací a chromozomových aberací, které se mohou projevit ve fenotypu jedince. Díky mutacím se v průběhu evoluce zvýšila variabilita populací, avšak přinesly sebou také mnohé nevyлéčitelné nemoci, které se dědí z generace na generaci. V současné době je v lidské populaci nejproblémovější a nejvíce zkoumané nádorové onemocnění, tedy nekontrolovaný autonomní růst buněk, které vede až ke smrti organismu (Friedberg a kol., 2006; Negritto, 2010).

Nejen díky závažným následkům DSBs, si buňky v průběhu evoluce vytvořily různé opravné mechanismy, které se souhrnně označují jako odpověď na poškozenou DNA (*DDR, DNA – damage response*). Slouží k detekci poškození, k signalizaci přítomnosti lézí a regulaci jejich oprav. Detekce poškození, signalizace poškození a oprava DNA pracují společně a sdílejí mnoho komponentů. Buňky defektní v těchto mechanismech se obecně projevují vyšší citlivostí na poškození DNA a způsobují onemocnění organismu (Jackson a Bartek, 2009).

Jedním ze základních znaků nádorového bujení je genomová nestabilita. Většina karcinomů vzniká a prograduje prostřednictvím poškození DNA a mutací. Defektní DDR běžně předurčuje k rakovině, přispívá k „mutátorovému fenotypu“ mnoha malignit a umožňuje přežití a proliferaci nádorových buněk, i přes zvýšenou míru mutací. Zejména aberantní buněčná proliferace, způsobená aktivací onkogenů nebo inaktivací tumor supresorů, vyvolává replikační stres, který je významným zdrojem genomové nestability. DDR tedy ve všeobecnosti představuje významný tumorsupresorový mechanismus (Jackson a Bartek, 2009).

Bližší pochopení mechanismů oprav poškozené DNA a jejich potenciální význam jako terapeutických cílů v onkologii naznačil klinický vývoj inhibitorů PARP. Členové rodiny PARP totiž patří mezi regulátory opravných mechanismů. PARylace zprostředkovaná Poly(ADP-ribose)polymerázami (PARPs) se jeví jako jedna z prvních posttranslačních změn v místě lézí, která stimuluje vazbu a regulaci mnoha proteinů odezvy poškození DNA.

Důležitý je zejména PARP1, který má více než 90% aktivitu v rámci PARP rodiny při opravě DNA, a proto je ve středu zájmu. Je zapojen v regulaci homologní rekombinace (HR), spojování nehomologických konců (NHEJ, *non – homologous end joining*), nejvíce však v alternativním spojování nehomologických konců (aNHEJ, *alternative non – homologous end joining*), což je převládající cesta pro vznik chromozomálních aberací a genomové nestability. Mechanismus této opravy ještě není plně prozkoumán, je však známo, že je aktivní zejména v nádorových buňkách. Proto se inhibitory enzymu PARP1 jeví jako nadějná cesta k léčbě rakoviny, zejména kvůli terapeutickým možnostem zesílení cytotoxického účinku radioterapie nebo chemoterapie (Byrne a kol., 2014; Davar a kol., 2012; Robert a kol., 2013; Venere a kol., 2014).

## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Dvouvláknové zlomy

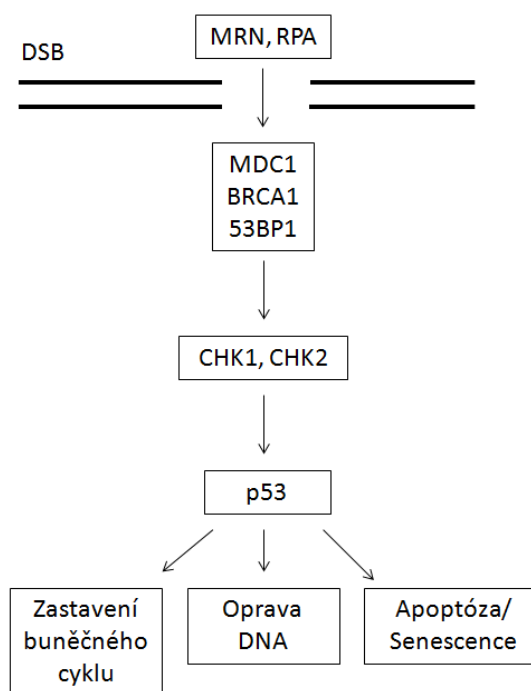
Zlomy jsou nejzávažnější poškození DNA. Důsledkem těchto zlomů bývají strukturní aberace chromozomů, které vznikají na základě chybného párování narušených konců chromozomů. Zlomy jsou jak jednovláknové (SSBs, *single strand break(s)*), tak dvouvláknové (DSBs, *double strand break(s)*). Faktory, které způsobují zlomy, jsou jak exogenního, tak endogenního charakteru. K endogennímu poškození dochází během buněčných procesů, jako je DNA replikace, DNA rekombinace, oxidativní metabolismus a působení topoizomeráz (Lieber a kol., 2010). Exogenní faktory zahrnují zejména ionizující záření, UV záření, chemické látky jako těžké kovy, alkylační látky, atd. (Miller a Therman, 2001). Ionizující záření poškozuje DNA přímo, zatímco UV záření, volné radikály a chemické látky indukují primární poškození DNA, které může být transformováno v jednovláknové a poté dvouvláknové zlomy (Lieber a kol., 2010). Přestože ozónová vrstva absorbuje nejnebezpečnější část slunečního ultrafialového spektra (UV typu C), zbytkové UV typu A a B silného slunečního záření, může způsobit až 100 000 lézí na exponovanou buňku za hodinu (Jackson a Bartek, 2009). Příkladem nepřímého poškození může být vznik zlomů na základě narušení cukerné složky molekuly DNA. Když hydroxylové radikály, vzniklé působením ionizujícího záření, atakují cukernou složku molekuly DNA, může dojít k přerušení vlákna jako sekundárnímu jevu. Například dávka radiace o síle 1 Gy může způsobit 600 až 1 000 jednovláknových a 16 až 40 dvouvláknových zlomů DNA na buňku (Friedberg a kol., 2006).

#### 2.1.1 Signalizace DDR

Klíčovými komponenty DDR signalizace u savců jsou proteinkinázy ATM a ATR, které jsou aktivovány přítomností DSBs a vazbou replikačního proteinu A (RPA) na jednovláknovou DNA (ssDNA, *single – stranded DNA*). Dva nejlépe prozkoumané cíle ATM/ATR jsou proteinkinázy CHK1 a CHK2, které spolu s ATM a ATR vedou ke snížení aktivity cyklín – dependentních kináz (CDK). K tomu dochází různými mechanismy, z nichž jsou některé zprostředkovány aktivací transkripčního faktoru p53 (Jackson a Bartek, 2009). Inhibice CDK zpomalí nebo zastaví buněčný cyklus v kontrolních bodech mezi G1 – S fází, inter – S fází a G2 – M fází, čímž je umožněna oprava DNA před replikací nebo následovnou mitózou (Jackson a Bartek, 2009).

Celý proces začíná, když je poškození DNA detekováno senzorovými proteiny, zahrnujícími MRN komplex, který rozpoznává DSBs a RPA vázající ssDNA. MRN komplex poté váže ATM a RPA váže ATR. ATM a ATR fosforylují histonovou variantu  $\gamma$ H2AX v oblasti DSB.  $\gamma$ H2AX zprostředkuje vazbu proteinu MDC1 do míst poškození. MDC1 udržuje a zesiluje DDR signalizaci akumulací MRN komplexu a aktivací ATM. Dále jsou do místa DNA poškození vázány mediátory BRCA1 a 53BP1. MDC1, BRCA1 a 53BP1 usnadňují signalizaci DDR, a ta je poté převedena na kinázy CHK1 a CHK2. Aktivované CHK1 a CHK2, společně s ATM a ATR, fosforylují efektorové proteiny jako p53, což má za následek buněčnou odpověď (viz obrázek č. 1) (Sulli a kol., 2012).

Souběžně s ATM/ATR závislými dráhami se na opravě podílejí transkripční nebo posttranskripční faktory a proteiny regulující opravu. DDR tak umožňuje obnovení normální funkce buněk, popřípadě pokud je poškození neopravitelné, aktivuje buněčnou smrt apoptózou nebo buněčnou senescenci (Jackson a Bartek, 2009).



**Obrázek č. 1:** Signalizace odpovědi na poškozenou DNA, DSB – dvouvláknový zlom. Poškození DNA je detekováno MRN komplexem a RPA, které váží ATM a ATR. Signál se přenáší na kinázy CHK1 a CHK2 a tento přenos je usnadněn mediátory MDC1, BRCA1 a 53BP1. Aktivované kinázy CHK1 a CHK2 spolu s ATM a ATR dále fosforylují proteiny, například p53, které vyvolávají buněčnou odpověď. Touto odpovědí může být zastavení buněčného cyklu, aktivace mechanismů oprav DNA nebo apoptóza, popřípadě buněčná senescence (Upraveno dle Sulli a kol., 2012).

## 2.1.2 Opravné mechanismy DSBs

Právě dvouvláknové zlomy bývají spravovány homologní rekombinací, která je primární opravnou dráhou nižších eukaryot (Lieber a kol., 2003). Za jistých podmínek se oprav účastní také podskupina opravného systému homologní rekombinace, tzv. *single strand annealing* (SSA). U vyšších eukaryot se však častěji vyskytuje spojování nehomologických konců chromozomů (NHEJ, *non – homologous end joining*) a v případě, že jsou jisté faktory NHEJ defektní nebo dokonce chybí, opravu vykonává alternativní spojování nehomologických konců (aNHEJ, *alternative non – homologous end joining*) (Bennardo a kol., 2008; Khanna a Jackson, 2001). Opravné mechanismy jsou závislé na klíčových faktorech, které je řídí. Tyto faktory jsou shrnuty v tabulce č. 1 (Frit a kol., 2014).

**Tabulka č. I:** Shrnutí základních proteinů pro opravy dvouvláknových zlomů DNA v HR, NHEJ a aNHEJ. Proteiny jsou rozděleny podle funkcí (Upraveno dle Mladenov a Iliakis, 2011).

Funkce	HRR	NHEJ	aNHEJ
Rozpoznání DSB	MRN	Ku70/86	PARP1
Zpracování konců	MRN, CtIP, EXO1, DNA2	Artemis	MRN, CtIP, PNK
Rekombinázy	RAD51		
Opravné mediátory	BRCA2, paralogy RAD51	DNA:PKcs	histon H1
Polymerázy	Pol $\delta$ a $\epsilon$	Pol $\mu$ a $\lambda$	Pol $\lambda$
Ligázy	Ligáza I	Ligáza IV	Ligáza I/III
Faktory podporující ligaci		XRCC4/XLF	XRCC1

### 2.1.2.1 Volba opravné dráhy

Buňka rozlišuje, zda upřednostní opravu HR nebo NHEJ na základě výskytu homologie. Konkrétní volbu typu opravy DNA ovlivňuje fáze buněčného cyklu, ve které se buňka momentálně nachází. HR je plně aktivovaná v S fázi, kdy je k dispozici homologní dárce. HR se uplatňuje i v G2 fázi, kde se také vyskytuje homologní sekvence (Daley a Sung, 2014; Lieber, 2010). Naopak NHEJ může opravit DNA v jakékoli fázi buněčného cyklu, protože nevyžaduje potřebu jakékoli homologie. A v případě mutace nebo absence jednoho z kanonických faktorů NHEJ, se opravy účastní alternativní NHEJ (Lieber a kol., 2010). Ten je nejvýkonnější v S a G2 fázi (Dueva a Iliakis, 2013).

Je logické předpokládat, že volba opravného mechanismu DSBs je regulována i jiným způsobem, než fází buněčného cyklu. Existují důkazy, že hladina exprese nebo posttranslační modifikace proteinů oprav DSBs, jakož i činnost CDK, se na regulaci podílejí (Mladenov

a Iliakis, 2011). V centru volby opravného mechanismu stojí protein BRCA1, typický pro HR a p53 – vázající protein 1 (53BP1), známý jako kontrolní bod DNA poškození. BRCA1 a 53BP1 působí ve volbě opravné dráhy jako vzájemní antagonisté. 53BP1 podporuje NHEJ a předchází HR, zatímco BRCA1 zajišťuje opačný účinek. V BRCA1 deficientních buňkách, 53BP1 potlačuje HR blokováním resekce DNA zlomů. Ztráta 53BP1 zmírňuje citlivost BRCA1 mutantních buněk k inhibici PARP a obnovuje HR (Bunting a kol., 2010; Panier a Boulton, 2014). Ve volbě mezi HR a NHEJ je zapojen i protein RIF1 (Rap1 interacting factor 1). Působí společně s ATM a 53BP1 v inhibici resekce DNA konců, usnadňuje NHEJ a inhibuje HR (Kumar a Cheok, 2014).

## 2.2 Homologní rekombinace

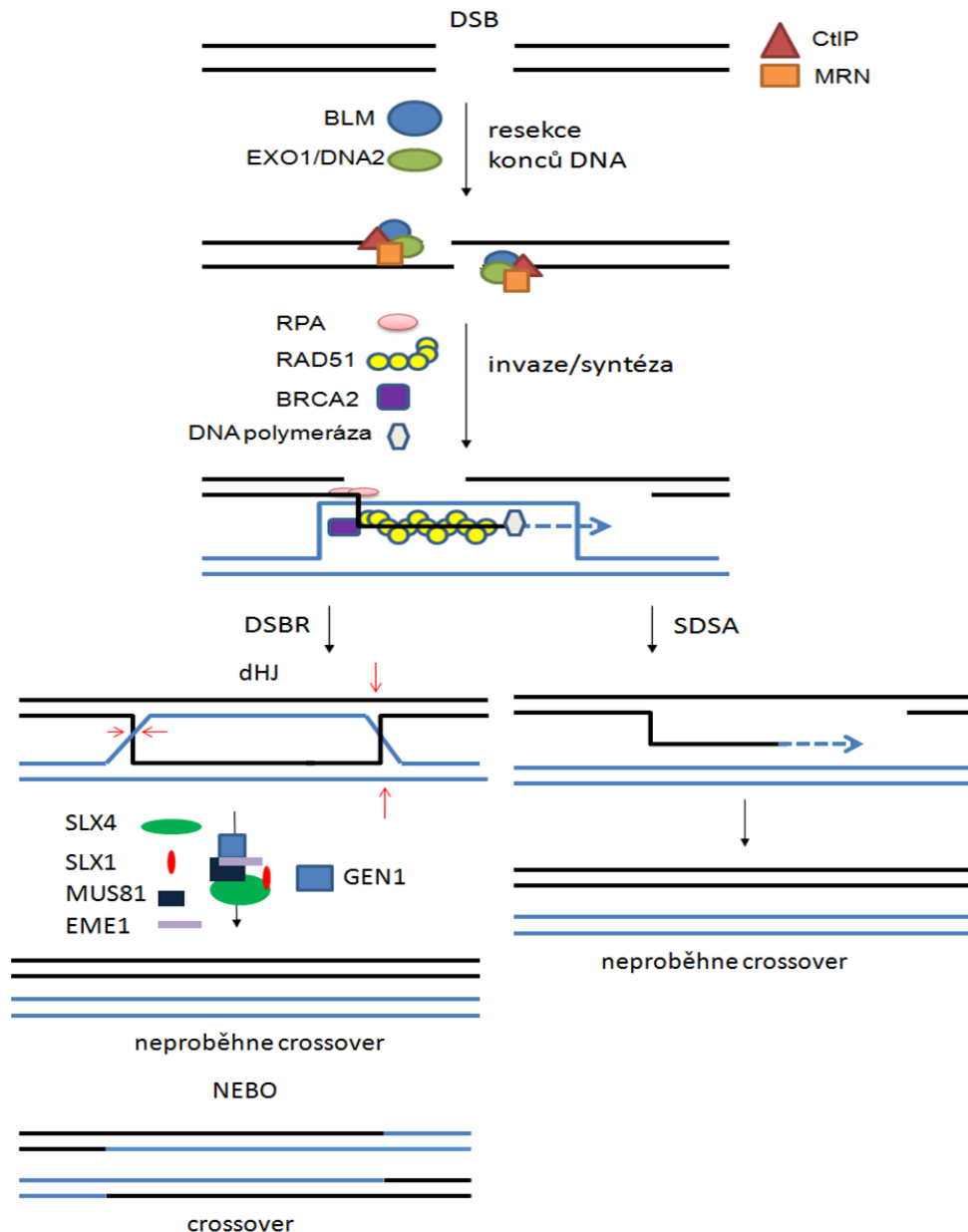
Homologní rekombinace je typ genetické rekombinace, který slouží jako opravný mechanismus odstraňující dvouvláknové zlomy DNA na základě využití informace na neporušeném homologním úseku, většinou na sesterské chromatidě (Lieber, 2010). Jelikož je při HR převážně potřebný výskyt sesterské chromatidy, probíhá tato oprava v pozdní S a G2 fázi mitotického dělení buněčného cyklu (Miller a Therman, 2001). K rekombinacím prostřednictvím HR dochází také v průběhu meiózy, což zajišťuje nové genetické variace v populacích, a tím i vývoj v průběhu evoluce. V profázi I meiózy jsou DSBs vytvářeny účelově, aby mohlo dojít k párování a rekombinaci mezi homologními chromozomy (*crossover*), čímž vznikají rekombinační chromozomy. HR se také využívá k restartu zastavené replikační vidlice a k opravě vazeb vláken DNA (Ding a kol., 2010; Jackson a Bartek, 2009).

### 2.2.1 Náležitosti HR

Předtím, než spolu mohou homologní DNA vlákna interagovat, musí se v buněčném jádře navzájem najít. Vzhledem k velikosti genomu je zřejmé, že se proces rozpoznání neděje náhodně, ale působí zde jisté mechanismy, které mohou zahrnovat specifické identifikátory. Ty rozeznají homologii i bez porovnání nukleotidových sekvencí, na základě strukturálních rysů specifických pro každý chromozom a současně brání nespécifickým kontaktům heterologních chromozomů. Během tohoto procesu jsou důležité také pohyby chromozomů v jádře (Ding a kol., 2010).

## 2.2.2 Proces HR

Jak již bylo zmíněno, HR se vyznačuje požadavkem homologní DNA sekvence jako opravného templátu, což vede k přenosu genetické informace do molekuly se zlomem. Děj probíhá ve čtyřech základních krocích. Prvním je resekce 5' konce DSB. Pro průběh HR je nezbytná přítomnost dostatečně dlouhého úseku ssDNA, který je u savců nejčastěji vytvářen nukleolytickou aktivitou MRN komplexu (u *Saccharomyces cerevisiae* MRX komplex). Komplex je tvořen třemi různými proteiny – MRE11-RAD50-NBS1 (Xrs2 u *Saccharomyces cerevisiae*). Součinností endonukleázy CtIP s MRN komplexem dochází k nukleolytické úpravě DNA konce. Následuje invaze vytvořeného 3' konce ssDNA poškozeného vlákna do homologní duplexní DNA sekvence nepoškozené DNA. Tento děj zajišťuje aktivita exonukleázy EXO1/DNA2. Vlákno je poté kryto RPA, naváže se protein BRCA2, a tím je zprostředkováno vytvoření nukleoproteinového filamentu RAD51, který katalyzuje hledání homologie. ssDNA v komplexu se zmíněnými proteiny invaduje nepoškozené templáty, následuje rozlišení substrátu, a poté se zapojují nukleázy a helikázy. Syntézu zajišťují polymerázy  $\delta$  a  $\epsilon$  a závěrem je procesování nebo zrušení tvořící se struktury, kdy je ligace konců zprostředkována Ligázou I (viz obrázek č. 2) (Jackson a Bartek, 2009; Mladenov a Iliakis, 2011; Muñoz-Galván a kol., 2013). Strukturou je čtyřcestný DNA meziprodukt HR neboli Hollidayův spoj (HJ, *Holliday junction*). Útvar má v lidských buňkách dva způsoby procesování, přičemž úspěšné rozštěpení je důležité pro správnou segregaci chromozomů. Na těchto způsobech se podílejí tři endonukleázy, a to SLX1-SLX4, MUS81-EME1 a GEN1. GEN1 a ostatní nukleázy představují dvě různé na sobě nezávislé dráhy procesování HJ (Wyatt a kol., 2013). Výsledkem eliminace HJ jsou dvě kompletní molekuly DNA, u kterých došlo k výměně homologních úseků (viz obrázek č. 2). Na štěpení HJ se podílí i BLM helikázový komplex. Absence BLM a SLX4 nebo GEN1 a SLX4 je v nepřítomnosti exogenního poškození DNA synteticky letální (Garner a kol., 2013). Během rekombinací může vznikat také *single – end invasion* (SEI), která vzniká při přechodu z DSBs do dvojité Hollidayovy struktury (dHJ, *double – Holliday junction*). SEIs vznikají na základě výměny vlákna mezi jedním koncem DSB a jeho homologem (Hunter a Kleckner, 2001).

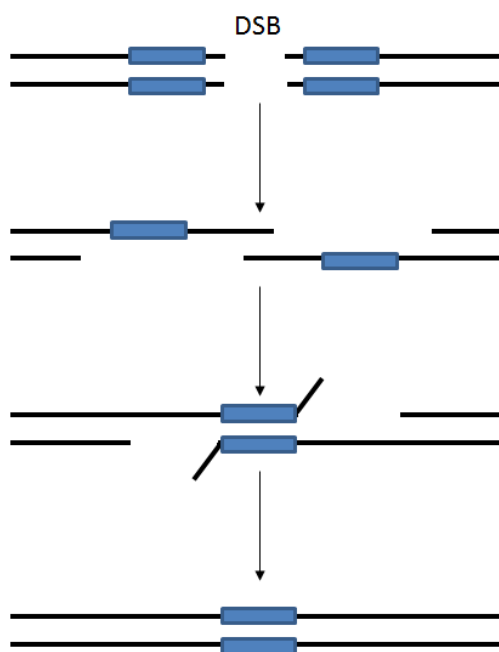


**Obrázek č. 2:** Oprava dvouvláknového zlomu homologní rekombinací, DSB – dvouvláknový zlom, DSBR – oprava dvouvláknového zlomu, SDSA – na syntéze závislý *strand annealing* (*synthesis dependent strand annealing*), dHJ – dvojitá Hollidayova struktura. Resekce konců je iniciována MRN komplexem, nukleázami CtIP a EXO1/DNA2 a BLM helikázou. V tomto kroku jsou odstraňovány nukleotidy na 5' koncích, což vede k jednovláknovým DNA přesahům na 3' koncích. Ty jsou následně pokryty RPA, který společně s BRCA2 zprostředkovává vytvoření nukleoproteinového filamentu RAD51. RAD51 katalyzuje hledání homologie, párování vláken a jejich výměnu. DNA polymeráza potom zprostředkuje syntézu nového vlákna. Zpracování vláken probíhá dvěma způsoby. Během SDSA invaduje homologní sekvenci jen jeden 3' konec opravované molekuly. Vytvoří jednoduchou Hollidayovu strukturu, přičemž výsledkem je oprava bez *crossoveru*. V DSBR formují strukturu oba 3' přesahy opravované DNA, za tvorby dHJ. GEN1, MUS81-EME1, SLX1-SLX4 poté dokončí zpracování dHJ struktury, přičemž výsledkem je obnovení sekvence DNA kolem DSB s nebo bez *crossoveru* (Upraveno dle Dueva a Iliakis, 2013; Shaheen a kol., 2011; Wyatt a kol., 2013).



### 2.2.3 Single strand annealing

*Single strand annealing* je typ homologní rekombinace, který se od HR liší pouze v potřebě kratší sekvenční homologie (Lieber, 2010). Je zahájen vznikem DSB mezi dvěma repeticemi ve stejné orientaci. Základem je resekce konců, za tvorby 3' ssDNA, což je pravděpodobně zprostředkováno komponenty HR. Jednovláknové (*single strand*) oblasti vznikají v blízkosti zlomu rozšířením repetice tak, aby na sebe mohla nasedat komplementární vlákna v reakci zprostředkované proteiny RPA a RAD52, za vzniku jednovláknového přečnávání. Tento meziprodukt je zpracován odštěpením přečnávání a vyplněním mezer (viz obrázek č. 3) (Bartos a kol., 2008; Sugawara a kol., 2000; Symington, 2002). Oprava je vždy nepřesná, protože dochází k odstranění jedné z repetic nebo je výsledkem translokace vzniklá ze dvou DSBs, vyskytujících se uvnitř nebo poblíž repetic na rozdílných chromozomech (Shaheen a kol., 2011).



**Obrázek č. 3:** *Single strand annealing*, DSB – dvouvláknový zlom, modrý obdélník – repetitivní sekvence, přečnávající vlákno – kotva. Pokud vznikne dvouvláknový zlom mezi repeticemi, dochází k resekci obou vláken ve směru 5' – 3', za vzniku 3' kotvy. Když jsou komplementární sekvence na obou stranách odkryty, mohou na sebe vlákna nasednout a vytvořit rozvětvený meziprodukt. Jednořetězcové kotvy jsou poté odstraněny nukleázou, dojde k vyplnění mezer a spojení konců ligázou (Upraveno dle Sugawara a kol., 2000).

## 2.3 Spojování nehomologických konců DNA

V neproliferujících buňkách nebo diploidních organizmech, které nejsou v S fázi, neexistuje žádný blízký homologní dárce. Z tohoto důvodu, se již brzy v evoluci vyvinula další forma opravy DSBs, umožňující spojování nehomologických konců DNA. NHEJ je přednostní volbou mimo S a G2 fázi, kde se nevyskytuje žádná homologní sekvence a v případě, že v S nebo G2 fázi není k dispozici homolog, oprava zlomů HR nemůže pokračovat a opravy se také ujímá NHEJ (Lieber, 2010).

Oprava může probíhat ve všech fázích buněčného cyklu, kromě mitózy. Mitotické kinázy fosforylují, krom jiných, i faktor NHEJ 53BP1, což brání jeho vazbě do chromatinu lemujícího DSB. Obnova akumulace 53BP1 v mitotických DSBs aktivuje opravu DNA, ale paradoxně, je i škodlivá. Oprava mitotických DSBs může vést k telomerickým fúzím, jejichž výsledkem jsou dicentrické chromozomy nebo aneuploidie (Orthwein a kol., 2014). Mechanismus NHEJ je náchylný k chybám nejen ve fázi mitózy. Oprava DSBs je často asociovaná s různě velkým přídavkem, respektive delecí nukleotidů ve vzniklých spojích, což mění sekvenci DNA. Mechanismus tedy primárně opravuje integritu molekuly, ale neobnovuje původní sekvenci DNA. I molekulární integrita však může být jen částečná, protože může docházet ke spojení DSBs z různých DNA molekul za vzniku chromozomálních aberací. Zatím není znám mechanismus, který při NHEJ zajišťuje opětovné selektivní spojení původních DNA konců, tedy obnovu původní molekuly (Mladenov a Iliakis, 2011).

### 2.3.1 Klíčové komponenty NHEJ

Vzhledem na vazebnou flexibilitu proteinů NHEJ, funguje tento mechanismus opravy DNA na široké škále konfigurací substrátů, které vznikají na DSBs, zejména v místech s oxidačním poškozením nebo ionizujícím zářením (Lieber, 2008). Na tyto substráty se jako první váže Ku70/86, který detekuje konce DSBs a dále katalyzuje vazbu nukleáz k resekci poškozené DNA, DNA polymeráz k vyplnění nově vznikající DNA a ligáz k obnovení integrity vláken (viz obrázek č. 4) (Lieber, 2008, 2010).

#### 2.3.1.1 Protein Ku

Ku je heterodimerický toroidní protein složený z monomerů o molekulové hmotnosti 70 a 86 kDa. Je prvním proteinem, který se váže na DSBs u obratlovců. Prvenství vazby je

díky velkému výskytu Ku v buněčném jádře, jenž je odhadován na 400 000 molekul na buňku a pevnější vazbě na duplexní DNA konce ve srovnání s jinými proteiny ( $K_d \sim 10^{-9}$  mol/l) (Lieber a kol., 2010). Ku nemá potvrzenou enzymatickou aktivitu. Jeho primární funkcí se zdá být zvýšení stability enzymů NHEJ na koncích DNA, aby mohly vykonávat svou aktivitu po delší dobu. Zároveň slouží jako jakási platforma pro jejich vazbu do míst poškození (Featherstone a Jackson, 1999; Lieber, 2008).

Ku mění při vazbě na DNA konformaci a vytváří Ku:DNA komplex, jenž může interagovat s nukleázami, polymerázami a ligázami NHEJ, a to v jakémkoli uspořádání. To zajišťuje možnost navázání DNA konců s různými sekvencemi a strukturou, a také rozmanitost výsledků vznikajících z identických výchozích konců. Předpokládá se, že tento komplex je vytvořen u obou spojovaných DNA konců, čímž jsou tyto konce modifikovány pro spojení (Lieber, 2010; Lieber a kol., 2010). Ku navíc po vazbě na DNA umožňuje vazbu DNA-PKcs do míst poškození, což aktivuje jeho kinázovou funkci (Featherstone a Jackson, 1999; van Gent a van der Burg, 2007).

#### **2.3.1.2 DNA-PKcs a Artemis**

DNA-PKcs je protein kináza o molekulové hmotnosti 469 kDa. Je klíčovým regulátorem endonukleotické aktivity proteinu Artemis. Aktivovaná DNA-PK stimuluje ligázovou aktivitu XRCC4:DNA Ligáza IV komplexu, a naopak přítomnost tohoto komplexu aktivuje autofosforylaci DNA-PKcs. Díky těmto vazbám může být DNA-PK rozhodující pro nukleolytické kroky a současně stimulovat děje NHEJ (Lieber, 2010).

Protein existuje v rámci buňky jako komplex Artemis:DNA-PKcs, který se váže na Ku:DNA komplex. Při pohybu Ku po DNA templátu dochází ke kontaktu DNA-PKcs s DNA konci, což vyvolá serin/threonin kinázovou aktivitu. To umožňuje autofosforylaci DNA-PKcs a fosforylaci Artemis. Autofosforylace způsobí konformační změnu DNA-PKcs, což reguluje přístup jiných NHEJ proteinů, a také mění konformaci Artemis. Ten získává aktivitu 5' nebo 3' endonukleázy s preferencí pro zanechání čtyřnukleotidového 3' přesahu. Konformační změna umožní endonukleázovou aktivitu i na dalších substrátech jako například SSBs, DSBs nebo štěpení DNA vlásenek v pozici dva nukleotidy od špičky (Lieber, 2008, 2010).

### 2.3.1.3 Polymerázová X rodina

V savčích buňkách se NHEJ mohou účastnit polymerázy z rodiny X polymeráz (u kvasinek pouze typ Pol4), a to polymeráza  $\mu$  (pol  $\mu$ ), polymeráza  $\lambda$  (pol  $\lambda$ ) a terminální deoxynukleotidyltransferáza, ta se však projevuje jen v B a T buňkách imunitního systému (Lieber, 2008).

Polymeráza  $\mu$  má tři základní funkce. První je schopnost templát dependentní syntézou opravit dvouvláknové zlomy DNA pomocí nehomologických 3' konců (Moon a kol., 2014). Další aktivitou je možnost polymerovat společně s Ku a XRCC4:DNA Ligázou IV napříč diskontinuálního vlákna templátu, tedy přecházet z jednoho DNA konce na druhý (Lieber, 2010). Poslední funkce je syntéza nezávislá na templátu, což umožňuje přidat náhodné nukleotidy na jakémkoli konci. Jako polymeráza náchylná k chybám však může sklouznout z templátového vlákna, což vede ke vzniku přímých repetice (Lieber, 2008). Pol  $\mu$  je fosforylována CDK2/cyklin A komplexem spojeným s S fází (Esteban a kol., 2013). Druhý typ polymerázy účastnící se opravy NHEJ je pol  $\lambda$ , která má templát dependentní polymerázovou funkci podmíněnou  $Mg^{2+}$  a syntézu nezávislou na templátu podmíněnou  $Mn^{2+}$  (Lieber, 2010).

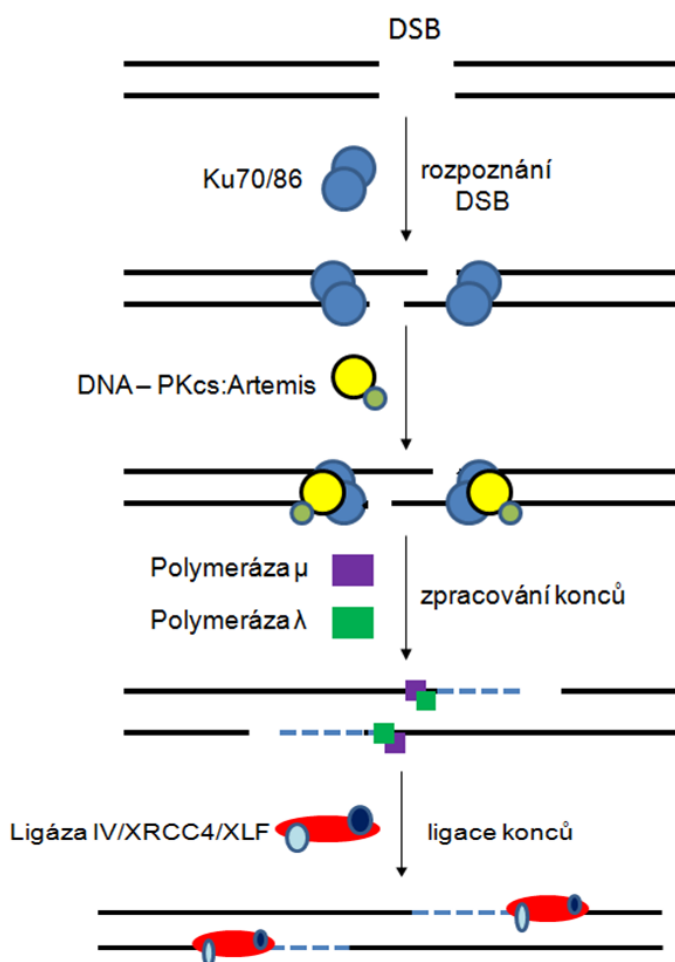
### 2.3.1.4 XLF, XRCC4 a DNA Ligáza IV

DNA Ligáza IV (Ligáza IV) umožňuje ligaci dvouvláknových DNA molekul, které mají kompatibilní přesahy nebo tupé konce. XRCC4 stabilizuje protein Ligázu IV a umožňuje vyšší aktivitu zvýšením účinnosti adenylace tohoto enzymu. XLF stimuluje funkci XRCC4:DNA Ligáza IV komplexu v přítomnosti dvojmocného kationtu  $Mg^{2+}$  (Davis a Chen, 2013; Lieber, 2008). XLF:XRCC4 komplex zároveň formuje filament, tvořící platformu pro ligaci DSBs bez potřeby dlouhých DNA konců. Vytvoření filamentu umožňuje ochranu a zarovnání obou DNA konců DSBs, zvyšujíc tak efektivitu ligace (Mahaney a kol., 2013).

XRCC4 se váže na tandemovou repetici BRCT (*BRCA1 C terminal*) DNA Ligázy IV, druhá doména BRCT DNA Ligázy IV umožňuje vazbu XRCC4 na DNA konce (Wu a kol., 2009). Komplex XRCC4:DNA Ligáza IV může vázat jedno vlákno nezávislé na druhém, a také ligovat i přes několikanukleotidovou mezeru. Pokud je přítomen Ku, může struktura spojovat i nekompatibilní DNA konce, které mají krátké přesahy, avšak s nižší účinností než při ligaci konců s mikrohomologií (Lieber, 2008).

### 2.3.2 Proces NHEJ

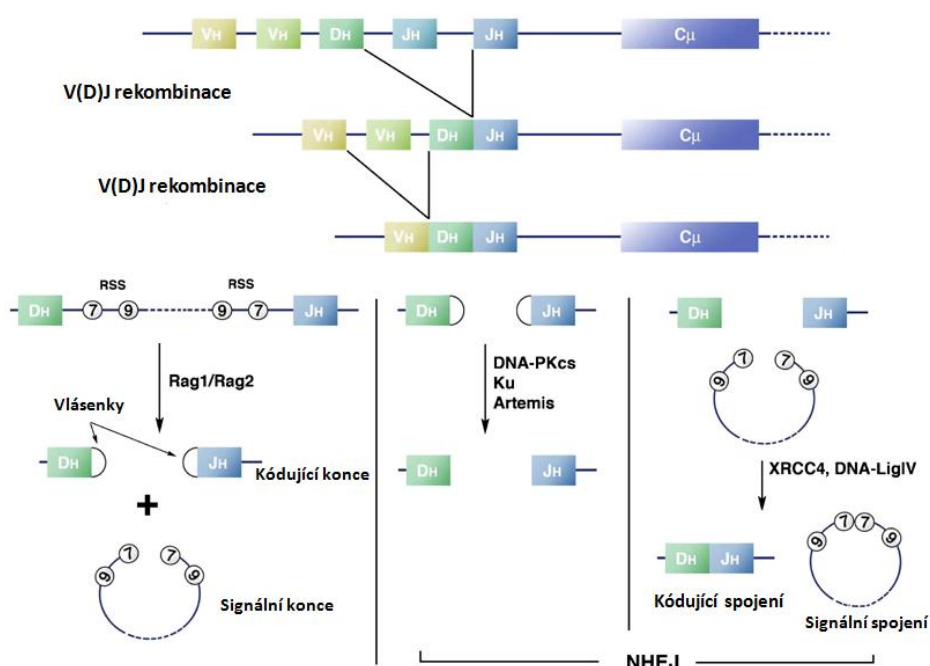
Proces NHEJ zahrnuje tři základní kroky. Nejdříve navázání na DNA konce, zpracování konců a nakonec ligaci konců. Jak již bylo zmíněno výše, v prvním kroku se protein Ku váže na DSB konce, zároveň je, přichystá na ligaci a zároveň je chrání před degradací. Po vazbě Ku na DNA vzniká základ pro vazbu ostatních proteinů účastnících se opravy. Ku katalyzuje zejména vazbu DNA-PKcs, a tím aktivuje jeho kinázovou aktivitu (Pastwa a Blasiak, 2003). Po navázání se aktivuje komplex Artemis:DNA-PKcs, který má aktivitu 5' – 3'endonukleázy a tvoří 3' přesahy. Ty jsou zpracovány pol  $\lambda$  a  $\mu$ , dochází k dosyntetizování vláken a komplex XLF:XRCC4:Ligáza IV spojí DNA konce (viz obrázek č. 4) (Lieber, 2008).



**Obrázek č. 4:** Oprava dvouvláknového zlomu prostřednictvím NHEJ. Asociace Ku70/86 s konci DNA usnadňuje vazbu DNA-PKcs, který následně tvoří komplex s Artemis. Artemis má endonukleázovou aktivitu a na spojovaných koncích vytváří přesahy. Polymerázy  $\lambda$  a  $\mu$  vyplňují mezery a komplex Ligáza IV/XRCC4/XLF zprostředkovává ligaci konců (Upraveno dle Lieber, 2008; Mladenov a Iliakis, 2011).

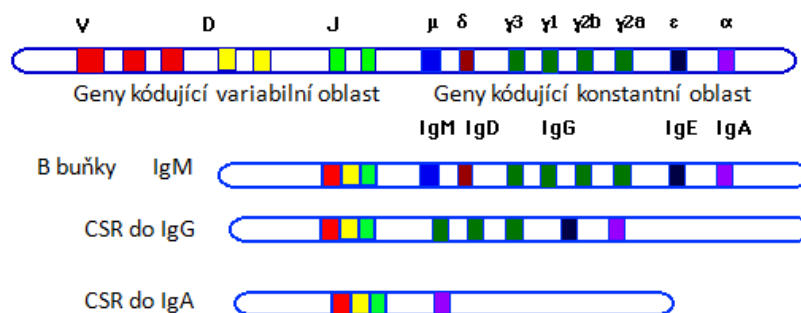
### 2.3.3 V(D)J a class switch rekombinace

V(D)J rekombinace je jedním ze dvou fyziologických systémů využívající úmyslnou tvorbu DSBs. Jedná se o mechanismus, na kterém je nejlépe prozkoumán NHEJ (Lieber, 2010). Během vývoje imunitního systému obratlovců jsou segmenty (V, D a J) imunoglobulinových genů a receptorů T buněk přeskupovány za tvorby DSBs. Procesu se zúčastňují stěžejní faktory NHEJ opravy, jako DNA-PKcs, Ku, Ligáza IV a XRCC4. Mechanismus zahajuje komplex RAG1/RAG2 proteinů (RAG komplex), které tvoří SSBs na specifických místech DNA a ty jsou vytvořením vlásenky převedeny na DSBs. (Dudley a kol., 2005; Lees-Miller a Meek, 2003) Nukleofilní atak generuje DNA vlásenku na obou kódujících koncích. V tomto bodě nastupují proteiny NHEJ. Dochází k otevření obou vlásenek prostřednictvím komplexu Artemis:DNA-PKcs, přidávání nukleotidů terminální transferázou, úpravě spojovaných konců polymerázami z rodiny X a spojení nehomologických konců (viz obrázek č. 5). Spojení dvou kódujících konců zajišťuje signální bod závislý na Ku a XLF:XRCC4:DNA Ligáza IV komplexu, ale nezávislý na Artemis:DNA-PKcs (Lieber, 2010; Soulas-Sprauel a kol., 2007).



**Obrázek č. 5:** VDJ rekombinace, RSS – rekombinační signální sekvence, NHEJ – spojování nehomologických konců. Komplex RAG1/2 zavádí dvouvláknový zlom do DNA na hranici D a J segmentu a jejich RSS a utváří se vlásenkou stažené kódující konce a tupé signální konce. Artemis, vázán a fosforylovan komplexem Ku:DNA-PK, otevírá vlásenku a endonukleázovou činností a aktivitou XRCC4:Ligáza IV vyplní kódující a signální spojení (Upraveno dle Soulas-Sprauel a kol., 2007).

Druhá fyziologická forma vzniku úmyslných DSBs je *class switch* rekombinace (CSR). Vyskytuje se pouze u B buněk, které již dokončily V(D)J rekombinaci (Lieber, 2010). Jedná se o mechanismus rozhodující o tvorbě různých izotypů protilátek (Mohammadinejad a kol., 2014). Systém mění produkci protilátek B buňkami z jedné třídy do druhé. DSBs jsou zavedeny do *switch* regionů (S regiony). Mění se konstantní oblast těžkého řetězce protilátky, což umožňuje rozdílné výsledky procesu tvorby imunoglobulinů. Variabilní oblast, generovaná během V(D)J rekombinace, zůstává stejná, a díky tomu se nemění antigenní specifita protilátky (viz obrázek č. 6) (Yan a kol., 2007). DSBs CSR jsou taktéž opravovány NHEJ. Na opravě se podílí i komplex XLF:XRCC4:DNA Ligáza IV, není však pro ni esenciální. To naznačuje výskyt alternativních cest mechanismu NHEJ při CSR (Simsek a Jasin, 2010).



**Obrázek č. 6:** Tvorba různých izotypů protilátek *class switch* rekombinacemi (CSR) (Upraveno dle <http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/immunology/humoral.html>)

## 2.4 Alternativní spojování nehomologických konců

V případě chybějících či mutovaných klíčových faktorů NHEJ, opravu vykonává alternativní NHEJ, často také označován jako záložní NHEJ (*backup NHEJ*) (Sharma a Raghavan, 2010). Vzhledem ke skutečnosti, že aNHEJ je typ opravy, který za jistých okolností využívá náhodnou mikrohomologii konců, existuje podmnožina opravy označovaná jako mikrohomologií zprostředkované spojení DNA konců (MMEJ, *microhomology – mediated end joining*) (Dueva a Iliakis, 2013). aNHEJ je využíván méně často než jiné formy oprav DSBs, jedná se však o převládající cestu pro vznik chromozomových translokací a telomerických fúzí (Byrne a kol., 2014). aNHEJ je aktivní zejména v nádorových buňkách, což přispívá k jejich genomové nestabilitě (Mansour a kol., 2013). Všeobecně je tedy aNHEJ více náchylný k chybám než NHEJ (Dueva a Iliakis, 2013).

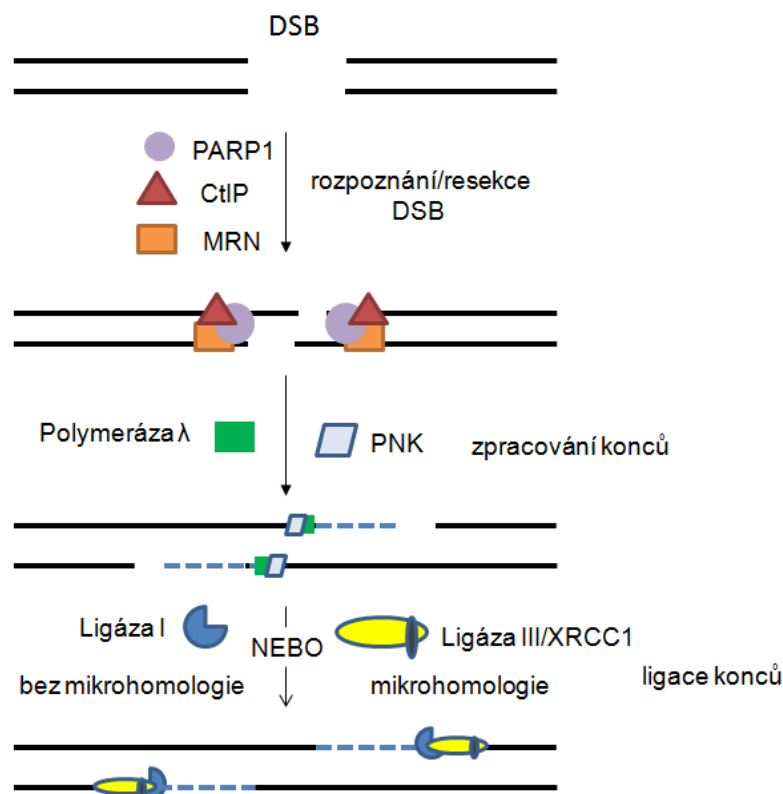
Mechanismus aNHEJ prokazuje, kromě jiných, i dřívější studie využívající SV40 DNA substráty testované v kultuře opičích buněk, kde došlo ke spojení DNA konců, i přes absenci klíčových proteinů asociovaných s NHEJ (Roth a kol., 1985). Dále také bylo identifikováno spojování DNA konců pomocí mikrohomologie u XRCC4 deficientních buněk (Sharma a Raghavan, 2010). Další experimenty s inhibicí proteinů zapojených do jednotlivých reparačních mechanismů prokázaly, že opravu nelze přičítat HR, ale je vskutku vykonána alternativní dráhou NHEJ (Mladenov a Iliakis, 2011).

Oprava prostřednictvím aNHEJ není ještě zcela popsána a může korelovat s mnoha molekulárními procesy, ale lze ji charakterizovat několika základními body – nevyžaduje rozsáhlou homologní sekvenci, je nezávislá na Ku70/86 nebo XRCC4 a Ligáze IV, je iniciovaná enzymem PARP1 a je asociovaná s delecí v opravených spojích, často pomocí mikrohomologie vzdálené od DSB (Sharma a Raghavan, 2010). MMEJ vyžaduje resekci a spojení konců skrze párování bází do mikrohomologních sekvencí (5 – 25 nukleotidů). Proto lze pozorovat některé společné kroky aNHEJ s HR (Truong a kol., 2013). Podle modelu vzniku DSBs, kdy je aNHEJ iniciován SSBs resekci se předpokládá, že je v opravě zapojena nukleázová aktivita MRE11 a CtIP, přičemž MRE11 nejen štěpí DNA konce, ale i odkrývá úseky mikrohomologie. V mechanismu je zapojen i 53BP1, který ve spojení s dalšími proteiny chrání spoje před nadměrnou delecí (Betermier a kol., 2014; Mansour a kol., 2013; Xie a kol., 2009).

#### **2.4.1 Enzymatická základna aNHEJ**

Proces aNHEJ je na rozdíl od NHEJ nezávislý na DNA-PKcs, Ku, Artemis, XRCC4 a DNA Ligáze IV, ale vyžaduje synapsi DNA konců enzymem PARP1, syntézu polymerázou  $\lambda$  a ligační činnost XRCC1:Ligáza I/III komplexu (viz obrázek č. 7) (Audebert a kol., 2004). Dále se opravy účastní i CtIP, BLM, EXO1, PNK nebo MRN komplex, a to především v S a G2 fázi, které jsou typické pro HR. Přesný mechanismus zapojení a funkce proteinů však ještě není úplně jasný (Dueva a Iliakis, 2013; Frit a kol., 2014).





**Obrázek č. 7:** Oprava dvouvláknového zlomu prostřednictvím aNHEJ. PARP1 rozeznává DNA konce DSB a po nasednutí iniciuje vazbu dalších enzymů. MRN komplex a CtIP zajišťují resekci konců. Úprava konců probíhá pravděpodobně prostřednictvím polymerázy  $\lambda$  a v případě nepřítomné mikrohomologie se na úpravě podílí PNK. Dále je ligace konců zajištěna komplexem Ligáza III:XRCC1 v případě přítomné mikrohomologie a naopak, jestliže se žádná mikrohomologie nevyskytuje, zajišťuje ligaci konců Ligáza I (Upraveno dle Dueva a Iliakis, 2011).

#### 2.4.1.1 PARP1 v aNHEJ

Funkce poly(ADP-riboza)polymerázy 1 (PARP1) v aNHEJ není ještě zcela objasněna, ale zřejmě detekuje DSBs a převádí je na signál, který vede ke zvýšení dostupnosti DNA konce pro ostatní enzymy. PARP1 nejprve detekuje přítomnost zlomů N – koncovou *zinc-finger* doménou a posléze katalyzuje polymerizaci ADP ribózy. Proces vede k posttranslační modifikaci histonů H1 a H2B, což způsobuje relaxaci chromatinové struktury, a tak i lepší přístupnost DNA. Auto – poly(ADP-ribozyl)ace enzymu PARP1 také iniciuje vazbu proteinu XRCC1, který koordinuje a stimuluje opravu DNA, prostřednictvím polymerázy  $\lambda$ , MRN komplexu a Ligázy III (nebo Ligázy I). PARP1 se zároveň účastní signalizace zprostředkované molekulami p53 a ATM nebo ATR, které zprostředkují zastavení buněčného cyklu, a tím vytváří dostatečný časový prostor pro opravu (Dantzer a kol., 2006; Frit a kol., 2014; Ko a Ren, 2012).

#### 2.4.1.2 Resekční enzymy

Pokud je to nutné, aNHEJ používá resekci k odkrytí mikrohomologie na jednom vlákně, kterou využívá k hybridizaci před procesem spojení konců. To vyžaduje nukleolytické zpracování DNA konců. Proces resekce je zahájen tvorbou poměrně krátkých úseků jednovláknové DNA působením součinnosti MRN komplexu a CtIP. Poté dochází k rozsáhlejší resekci prostřednictvím exonukleázy EXO1 nebo BLM/DNA2 komplexu (Huertas, 2010).

#### 2.4.1.3 Polymeráza $\lambda$ a PNK

Pravděpodobný kandidát pro syntézu na opravovaných DNA koncích při aNHEJ je polymeráza  $\lambda$ , která vykazuje syntézu jak podmíněnou, tak nepodmíněnou templátem (aktivita terminální transferázy). Polymeráza  $\lambda$  přednostně vyplňuje mezery mezi konci opatřenými částečně komplementárními přesahy. Její aktivita v tomto mechanismu zahrnuje nestabilní spoj vzniklý nasednutím přesahu 3' konce ssDNA na mikrohomologní regiony (Nick McElhinny a kol., 2005; Lieber, 2010).

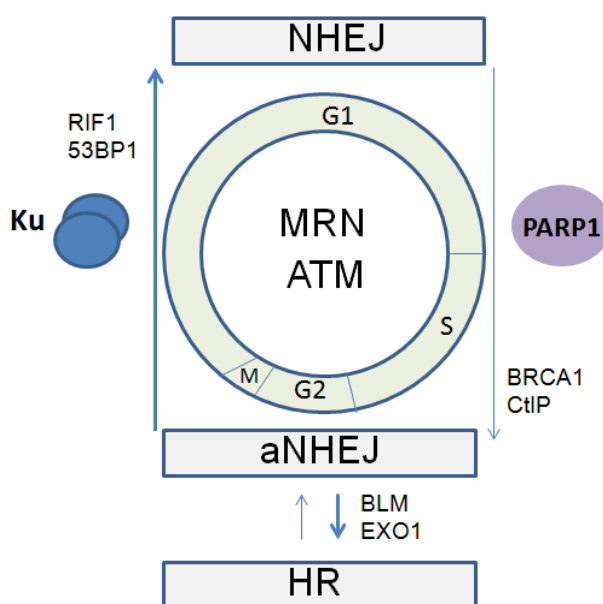
Limitující krok pro opravu nekompatibilních konců je přidavek fosfátu na 5' konec. Tuto aktivitu zajišťuje polynukleotidová kináza (PNK), která interaguje s XRCC1 (Weinfeld a kol., 2011).

#### 2.4.1.4 Ligáza I/III a XRCC1

Ligace probíhá prostřednictvím Ligázy III, popřípadě Ligázy I (u *S. cerevisiae* pouze Ligáza I) (Lieber, 2010). Ligáza III je zapojena v případě opravy s použitím přítomné mikrohomologie, zatímco Ligáza I se účastní dráhy nezávislé na mikrohomologii (Frit a kol., 2014). Interakce Ligázy III s XRCC1 a MRN komplexem umožňuje intermolekulární ligaci kompatibilních konců. Ligáza I je schopna propojit nekompatibilní konce, například spojením přes mezery v ligovaném vlákně, i když se stále menší účinností než klasický NHEJ. Také ligace neslučitelných konců je stimulována MRN komplexem. Ligace je však o něco více účinná s terminální mikrohomologií dvou nebo tří párů bází, které stabilizují DNA konce. Z toho důvodu se při absenci Ligázy IV u spojených konců většinou vyskytuje právě dvou až tří bázová mikrohomologie (Della-Maria a kol., 2011; Lieber, 2010; Simsek a kol., 2011).

## 2.4.2 Regulace aNHEJ

CtIP, kromě vazby s MRE11 a podpory nukleázové aktivity komplexu, působí také jako transkripční faktor. Mohl by tedy napomáhat aNHEJ při zpracování DSBs konců vzniklých z SSBs otevřením chromatinu nebo ovlivněním jiných procesů opravy (viz obrázek č. 8). CtIP má nejvyšší aktivitu během S fáze, dá se tedy předpokládat, že podporuje opravu v pozdějších fázích buněčného cyklu (Bennardo a kol., 2008). aNHEJ je také regulován Ku, který je v přímé kompetici s PARP1 v rámci vazby na konce DSBs (viz obrázek č. 8). Ku inhibuje vazbu PARP1 a jeho interakčních partnerů a zároveň je inhibována polymerace ADP-ribózy. Ku má všeobecně vyšší vazebnou afinitu k DNA koncům, a je tedy negativním regulátorem aNHEJ (Wang a kol., 2006). BLM helikáza působí proti dlouhým delecím, závislým na CtIP/MRE11 a potlačuje aNHEJ spolu s 53BP1 a RIF1 (viz obrázek č. 8). BLM může tedy také negativně regulovat aNHEJ (Grabarz a kol., 2013). A s ohledem na mechanismy resekce a zpracování 3' konců bylo zjištěno, že aNHEJ je mírně inhibován RAD52 (Bennardo a kol., 2008). Dále DNA-PKcs potlačuje aktivitu PARP1, a naopak aktivita DNA-PKcs je stimulována modifikací prostřednictvím PARP1 (Wang a kol., 2006).



**Obrázek č. 8:** Regulace mezi opravnými dráhami HR, NHEJ a aNHEJ. NHEJ ovlivňuje aNHEJ i HR, a to především přítomností Ku, který kompetuje s PARP1 o DSB substrát. ATM dependentní dráhy DDR usnadňují opravu NHEJ v G1 fázi a HR v S/G2 fázi buněčného cyklu. Aktivace ATM vede k fosforylaci 53BP1 a následně tvorbě 53BP1:RIF1 komplexů. V G1 fázi 53BP1:RIF1 potlačuje CtIP a BRCA1, a tím podporuje NHEJ a potlačuje aNHEJ. V S a G2 fázi CtIP asociuje s BRCA1, což vede k uvolnění RIF1 a podpoře aNHEJ. Rozšíření resekce prostřednictvím EXO1 a BLM vede k posílení HR (Upraveno dle Frit a kol., 2014).

### 2.4.3 aNHEJ a telomerické fúze

Telomery jsou nukleoproteinové struktury, které poskytují ochranu koncům chromozomů. U savců se skládají z TTAGGG repetitivních sekvencí, které jsou spojeny a chráněny *shelterinem*, což je komplex telomer – vazebných proteinů. Ty zahrnují i proteiny vázající se na dvouvláknovou DNA, jako TRF1 a TRF2, a také POT1, který interaguje s TPP1 a společně chrání jednovláknové přesahy bohaté na guanin. Telomery udržuje enzym telomeráza, který je však aktivní jenom v embryonálních, kmenových a velké části nádorových buněk, a proto v somatických buňkách dochází k postupnému zkracování telomer. Telomery zkrácené pod jistý limit resp. dysfunkční telomery již nevykonávají ochranou funkci chromozomů a jsou detekovány jako DSBs (Rai a kol., 2010).

Oprav DSBs v rámci nefunkčních telomer se účastní jak HR, tak i NHEJ a aNHEJ. aNHEJ je však nejčastější typ pro spojení těchto chromozomů, a to jak u vyvolané dysfunkce, tak u přirozeně se zkracujících telomer, což vede k nestabilitě genomu. Opravná dráha k zahájení chromozomální fúze je volena na základě přítomných proteinů. HR je potlačena TPP1-POT1 a TRF2 ve spolupráci s 53BP1. TRF2 inhibuje NHEJ závislý na ATM, Ligáze IV a 53BP1. TPP1 a POT1 potlačují aNHEJ, a to ve spolupráci s TRF2, Ku a 53BP1. Při aNHEJ u telomer s chybějícím TPP1-POT1 se účastní ATR a CtIP. Na druhé straně, při nepřítomnosti Ku u buněk s chybějícím TPP1-POT1, dominuje aNHEJ. Tento model připomíná kompetici PARP1 a Ku a naznačuje, že se fúze telomer řídí podobnými pravidly. Také DNA-PK je ochranný faktor proti aNHEJ (Dueva a Iliakis, 2013; Frit a kol., 2014; Rai a kol., 2010).

### 2.4.4 aNHEJ a chromozomální translokace

Chromozomální přestavby, jako výsledek chybně opravených zlomů, by mohly mít za následek zvýšení nestability chromozomů a následnou nádorovou transformaci nebo progresi nádoru. aNHEJ oprava stojí za genomickou nestabilitou a je významnou měrou zapojená do vzniku chromozomálních aberací, včetně translokací a delecí. Translokace je proces, ve kterém fúzí částí dvou různých nehomologických chromozomů (Li a kol., 2011; Rai a kol., 2010).

Kinetika opravy aNHEJ je asi 10 krát pomalejší než NHEJ, což zvyšuje dobu, po kterou dva zlomy zůstávají neopravené, čímž se zvyšuje pravděpodobnost translokace. To potvrzují i studie, které zjistily, že onkogeny důležité v patogenezi leukémie jsou regulovány hladinou proteinů NHEJ a stimulovány klíčovými faktory aNHEJ, což vede ke zvýšení

frekvence translokací a delecí, které pravděpodobně řídí genomovou nestabilitu, progresi onemocnění nebo rezistenci na léčbu (Li a kol., 2011). Například exprese onkogenních fúzovaných genů BCR-ABL, které jsou spojeny s chronickou myeloidní leukémií (CML), a tím provázenou zvýšenou tvorbou reaktivních forem kyslíku, tedy i větším výskytem DSBs, jsou výsledkem reciproké translokace. Je možnost, že zlomy indukované reaktivními formami kyslíku jsou opravovány aNHEJ, a tak je umožněno přežití buňky. Ovšem oprava je náchylná k chybám, a to může vést k progresi onemocnění (Dueva a Iliakis, 2013).

Výzkum také prokázal, že vyčerpání CtIP, resekcčního faktoru DNA konců, má za následek podstatné snížení frekvence chromozomálních translokací, a také, že při použití mikrohomologie při aNHEJ dochází v opravě zlomů, tvořených v CtIP deficientních buňkách, k výrazně menšímu počtu translokačních událostí. Proto lze tvrdit, že aNHEJ zprostředkovaná pomocí CtIP má hlavní roli při tvorbě translokací (Zhang a Jasin, 2011). Na druhou stranu, XRCC4:Ligáza IV komplex potlačuje translokace, což naznačuje, že NHEJ působí proti vzniku chromozomálních translokací (Simsek a Jasin, 2010).

#### **2.4.5 aNHEJ v imunitním systému**

Nedostatky ve vývoji imunitního systému mohou vést k těžkému syndromu kombinované imunodeficiency (SCID – *severe combined immunodeficiency syndrome*), což je často spojeno s mutacemi proteinů opravných drah DNA. DSBs indukované RAG1/RAG2 jsou zpracovány NHEJ, dochází tedy k potlačení aberantních rekombinačních událostí. Díky mutacím destabilizujícím RAG komplex, jsou konce DBSs volné pro HR nebo aNHEJ opravy vedoucí k CSR, ale také genomické nestabilitě (Dueva a Iliakis, 2013).

CSR nejsou přímo ovlivněny nepřítomností DNA-PKcs a je zde pravděpodobná účast Ligázy I nebo Ligázy III, vzhledem k využití mikrohomologie na *switch* regionech. Je však zajímavé, že XRCC1 není u CSR při aNHEJ podmiňující a jeho absence dokonce mírně zvyšuje účinnost (Dueva a Iliakis, 2013). PARP1 podporuje roli aNHEJ, zatímco PARP2, který je zřejmě také zapojen do této opravy, potlačuje translokace v CSR (Robert a kol., 2009). Paradoxně, inhibice ATM snižuje chyby CSR v buňkách s chybějícím 53BP1 poklesem resekce. To naznačuje, že stejně jako ve V(D)J rekombinacích, má ATM roli antagonisty při stabilizaci synapse a zvýhodňuje resekce. Z toho vyplývá, že ATM podporuje NHEJ i aNHEJ. Také MRN komplex se účastní stabilizace synapse svou přemostovací funkcí a současně i resekce konců. Delece MRE11 poškozuje CSR a vede k nižší mikrohomologii

v S regionech. CtIP se zapojuje do CSR podporou resekce (Bothmer a kol., 2010; Dinkelman a kol., 2009; Williams a kol., 2008).

Co se týká role aNHEJ při CSR v přítomnosti NHEJ, některé S regiony často využívají mikrohomologii vyšší než 4 nukleotidy, v souladu s výsledky aNHEJ. Nicméně, repetitivní sekvence v S regionech představují možnost uplatnění jakékoli mikrohomologií zprostředkované opravy, proto je potřeba pro důkaz aNHEJ potvrdit činnost Ligázy III (Frit a kol., 2014).

#### **2.4.6 Role aNHEJ v nádorovém bujení**

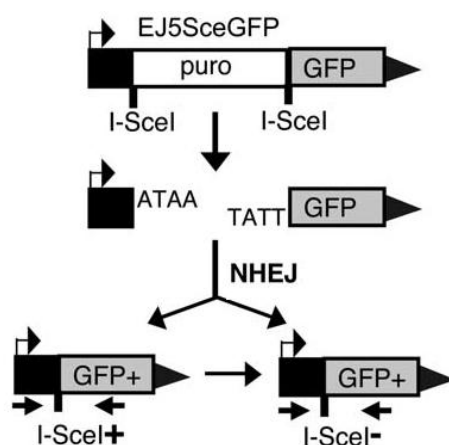
Na podporu role aNHEJ v karcinogenezi, studie navrhuje posun rovnováhy od NHEJ k aNHEJ v nádorových buňkách. Pomocí dosud nejasných mechanismů, mohou být za určitých okolností onkogenní tyrozin kinázy podstatné pro posun mezi těmito opravami, které tím podporují genomickou nestabilitu. V souladu s tímto tvrzením bylo také zjištěno, že nádorová progresse a agresivita koreluje s nízkou aktivitou Ku v karcinomech bazálních buněk (Mazzarelli a kol., 2003). Je však zajímavé, že časná stádia nádorů korelují spíše se zvýšenou aktivitou Ku, což ukazuje dvoufázovou progresi rakoviny, kdy brzká stádia souvisí s hyperaktivitou NHEJ a pozdní s posunem k aNHEJ (Bentley a kol., 2004). Komponenty NHEJ a aNHEJ pak mohou být považovány za nové biomarkery pro identifikaci nádorů, potencionálně reagujících na léčbu cílenou na NHEJ nebo aNHEJ. Tyto údaje zdůvodňují návrh pro nové chemoterapeutické postupy zaměřené na aNHEJ. Slibnou strategií je kombinace inhibitorů PARP1 a nově vyvinutých inhibitorů Ligázy III, přednostně zabíjejících hormon – rezistentní buňky rakoviny prsu nebo CML buňky rezistentní na BCR-ABL orientované tyrozin kinázy, které vykazují zvýšené úrovně PARP1 a Ligázy III (Frit a kol., 2014).

#### **2.4.7 Reportéry pro měření NHEJ a aNHEJ**

Bennardo a kolektiv (2008) vytvořili eseje pro měření jednotlivých oprav DSBs. Zejména prezentovali esej pro měření aktivity dráhy, která má za následek delece mutací, často prováděné krátkými homologními sekvencemi ve výsledném spoji, tedy aNHEJ. K monitorování oprav využili chromozom integrované reportéry nesoucí rezistenci proti puromycinu a endonukleázu I-SceI k tvorbě DSBs. Jednotlivé reportéry byly navrženy tak, že oprava I-SceI indukovaných DSBs specifickou cestou obnovuje GFP expresní kazetu.

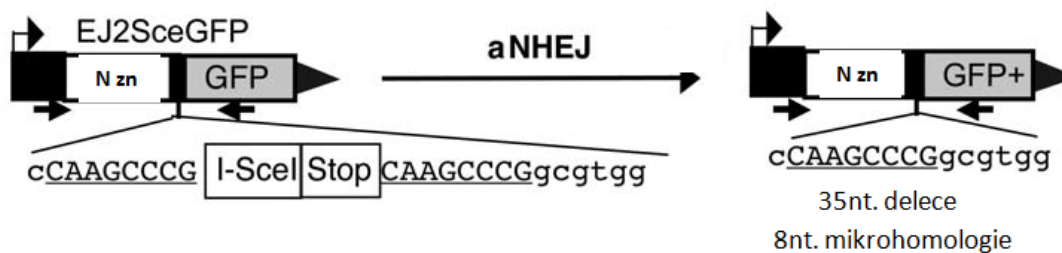
Reportér EJ2 pro detekci aNHEJ byl odvozen od reportéru EJ5 pro celkový NHEJ (Bennardo a kol., 2008).

Reportér pro měření všech událostí NHEJ obsahuje promotor, který je pomocí puromycinového genu oddělen od GFP kódující kazety. Gen pro puromycin je ohraničen dvěma I-SceI místy ve stejné orientaci a je tedy následovně vystřižen na základě opravy I-SceI indukovaného DSB prostřednictvím NHEJ. Promotor se připojí ke zbytku expresní kazety a dojde k obnovení exprese GFP+ genu (viz obrázek č. 9) (Bennardo a kol., 2008).



**Obrázek č. 9:** EJ5-GFP, černý obdélník – promotor, puro – puromycinový gen (Upraveno dle Bennardo a kol., 2008; Gunn a Stark, 2012).

Reportér pro měření aNHEJ obsahuje jednu expresní kazetu pro N – koncovou značku, fúzovanou s GFP. Kromě toho je kódující sekvence přerušena mezi značkou a GFP prostřednictvím I-SceI míst, následovaných stop kodony ve všech třech čtecích rámcích. I-SceI místa a stop kodony jsou ohraničeny 8 nukleotidovou mikrohomologií. Pokud tato mikrohomologie nasedá během aNHEJ, obnoví se funkční GFP kazeta a dojde k deleci 35 nukleotidů, což je pro aNHEJ charakteristické (viz obrázek č. 10) (Bennardo a kol. 2008).



**Obrázek č. 10:** EJ2-GFP, N zn – N – koncová značka, nt – nukleotidy (Upraveno dle Bennardo a kol., 2008; Gunn a Stark, 2012).

## 2.5 PARP1

Poly(ADP-ribóza)polymeráza 1 (PARP1) je jedním ze 17 členů enzymatické rodiny poly(ADP-ribóza)polymeráz (PARPs) (Ko a Ren, 2012). PARPs se podílí na mnoha procesech, které jsou důležité k udržení integrity genomu. Jejich aktivita je pozorována u mechanismů souvisejících jak se stresem indukovaným poškozením DNA, tak s programovaným poškozením DNA. Jak bylo výše zmíněno, slouží jako platforma pro lokální zapojení proteinů účastnících se opravy DNA, dále vhodně formují chromatin pro účinnost opravy, účastní se opravy SSBs, jsou zapojeny do restartu replikační vidlice homologní rekombinace, a také do nukleotidové a báze excizní opravy. Navíc generují diverzitu imunitního systému, zdravé gamety pro sexuální reprodukci a zřejmě usnadňují virovou integraci (Robert a kol., 2013).

PARP1 je díky chromatinové přestavbě a rozpoznávání motivu nezbytný pro zahájení různých forem oprav DNA, a také hraje důležitou roli v regulaci genové exprese. Enzym se aktivuje po vazbě na SSB nebo DSB (Ko a Ren, 2012). Poté použije  $\text{NAD}^+$  jako substrát a odštěpením nikotinamidu ze substrátu kovalentně spojí ADP-ribozylovou část s vhodným akceptorovým proteinem. Tak prodlužuje řetězce ADP-ribózových jednotek a tvoří polymer (PAR) (Bürkle a Virág, 2013). Podle toho, jak velké množství PAR je přidáno, PARP1 moduluje aktivitu svých substrátů, včetně sama sebe, k ovládní několika důležitých buněčných procesů jako opravě DNA, regulaci transkripce nebo buněčné smrti. PAR je však nestabilní a po dokončení své funkce je rychle degradován činností poly(ADP-ribóza)glykohydrazí nebo PAR hydrolázy. Samotný PARP1 je hlavním akceptorem PAR. Jeho rozsáhlá větvení na PARP1 pomáhají při sestavení multiproteinového komplexu zapojeného do chromatinové přestavby, opravy DNA a signalizace kontrolních bodů poškození. Důležité substráty PARP1 jsou histony H1 a H2B, které po přemístění ADP-ribozylací umožňují dostupnost výše zmíněných proteinových komplexů zapojených během DNA opravy a transkripce. Znamé cíle jsou transkripční faktory a koagulatory, například hnRNP K (heterogenní jaderný ribonukleoprotein K), které se po ADP-ribozylaci oddělí od DNA a změní transkripci profilů exprese. PAR také váže protein ATM, aktivující signální kaskádu poškození DNA a zastavující buněčný cyklus. Kromě aktivace a vazby jaderných proteinů, působí PARP1 také přímou modifikací aktivity a lokalizace proteinů. Aktivitu PARP1 mohou stimulovat i další zástupci PARP rodiny, jako PARP2 nebo PARP3, občas však mohou působit i protichůdně (Ko a Ren, 2012).



## 2.5.1 PARP inhibitory

PARP inhibitory se díky ovlivnění mechanismů oprav DNA zdají být nadějným terapeutickým prostředkem v onkologii (Davar a kol., 2012). Kromě jejich kompetitivního katalytického inhibičního mechanismu, inhibitory PARP vykonávají svou cytotoxicitu hlavně zachycením PARP:DNA komplexů. Inhibitory vychytávající komplexy jsou například olaparib či veliparib. Katalytické PARP inhibitory jsou velmi účinné v kombinaci s kamptoteciny, zatímco inhibitory schopné zachycovat PARP komplexy jsou efektivnější při použití temozolomidu (Murai a kol., 2014).

Podle posledních výzkumů jsou PARP proteiny důležitou hnací silou v koordinaci, signalizaci a opravě DNA. Co je však důležité, inhibice PARP představuje v současné době jeden z nejslibnějších přístupů k zesílení radioterapie nebo chemoterapie. Inhibitory PARP enzymů také, v důsledku efektu syntetické letality, zvyšují citlivost tumorů postrádajících jednu nebo více drah opravy DNA (Robert a kol., 2013).

### 2.5.1.1 Syntetická letalita

Syntetická letalita nastává, pokud je mutace jednoho ze dvou genů slučitelná se životaschopností buňky, ale kombinace mutací obou genů vede ke smrti. Tento poznatek je vhodný pro cílenou léčbu nádorů, se zaměřením na mutovaný rakovinový gen synteticky letální pro rakovinné buňky, avšak šetrný k normálním buňkám (Kaelin, 2005). Takový stav nastává i mezi geny jednotlivých oprav DNA (Shaheen a kol., 2011).

Syntetickou letalitu velmi dobře charakterizuje vztah mezi mutací BRCA a inhibicí PARP1. BRCA1 nebo BRCA2 jsou tumor supresorové geny, které se podílejí na opravě dráze homologní rekombinace. Jak již bylo zmíněno, zatímco HR produkuje minimum chyb, ostatní mechanismy opravy DSBs jsou náchylné k chybám a vedou ke genomické nestabilitě. PARP1 se kromě aNHEJ účastní také opravy jednovláknových zlomů prostřednictvím BER dráhy (*Base excision repair*). Inhibice PARP1 vede k hromadění neopravených SSBs, což má za následek zhroucení replikačních vidlic, a s tím spojený vznik DSBs. Jestliže tyto zlomy nejsou opraveny HR, nastává buněčná smrt. Pokud jsou BRCA1 anebo BRCA2 defektní, HR nefunguje a při současné inhibici PARP1 dochází k synteticky letálnímu efektu (Dedes a kol., 2011; Helleday, 2011; Shaheen a kol., 2011).

### 3 Cíl práce

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo zjistit vliv inhibice enzymu PARP1 na alternativní spojování nehomologických konců v buněčných nádorových liniích *in vivo*. Dále bylo zjišťováno zastoupení alternativní dráhy v rámci celkového spojování nehomologických konců a ovlivnění této celkové opravy inhibicí enzymu PARP1. Úroveň výskytu jednotlivých drah byla detekována specifickými fluorescenčními reportéry, což je nový, prozatím nevyzkoušený postup.

## **4 Materiál a metody**

### **4.1 Materiál**

#### **4.1.1 Pomůcky a přístrojové vybavení**

Při zpracování experimentální části bakalářské práce byly použity následující pomůcky a přístroje: flowbox s horizontálním prouděním vzduchu Thermo Fisher Herasafe, CO<sub>2</sub> inkubátor Heracell, analyzátor viability buněk BECKMAN COULTER Vi-Cell XR, Bürkerova komůrka, světelný mikroskop Zeiss, invertovaný fluorescenční mikroskop Carl Zeiss, elektroporační systém Amaxa Nucleofector, průtokový cytometr Beckman Dickinson Influx, centrifuga Hanil.

#### **4.1.2 Chemikálie a roztoky**

Při jednotlivých experimentech byly použity následující chemikálie: trypsin (TrypLE, Invitrogen), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Sigma), dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma), fetální bovinní sérum (FBS) (Invitrogen), puromycin dihydrochlorid (Sigma), optiMEM (Invitrogen), siRNA Ku80 (100 mmol/l) (MWG Operon 5' – AGAAGGUCUUGAGAUAGUG(dTdT) – 3'), KU 58948 (Astra Zeneca), ICAfectin 451 (Eurogentec), Lipofectamine 2000 (Invitrogen), FuGENE HD Transfection Reagent (Roche), roztok 1 x PBS (pH 7,2) složený z 3,2 mg/ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 mg/ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 mg/ml KCl a 135 mg/ml NaCl a médium DMEM (GEHealthcare) obohacené o penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 U/ml) a FBS 10% (v/v).

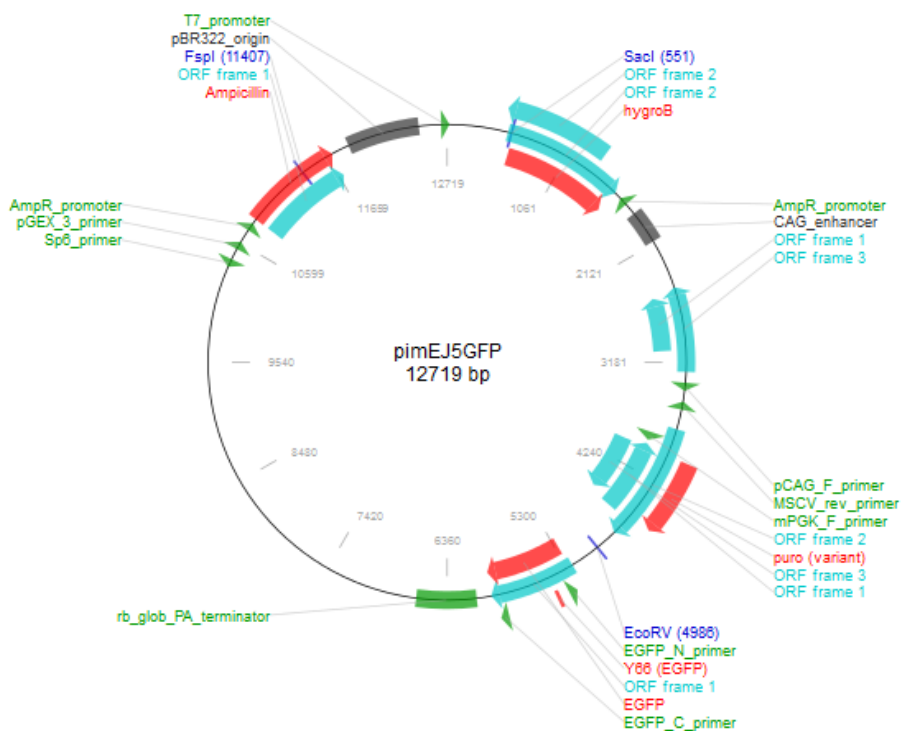
#### **4.1.3 Buněčné linie**

Pro experiment byly použity buněčné linie U2OS a HEK293T. U2OS, jedna z prvních získaných buněčných linií, je odvozená z osteosarkomu patnáctileté ženy. HEK293T je buněčná linie získaná z embryonálního stádia ledvin zdravého potráceného lidského plodu (ATCC).

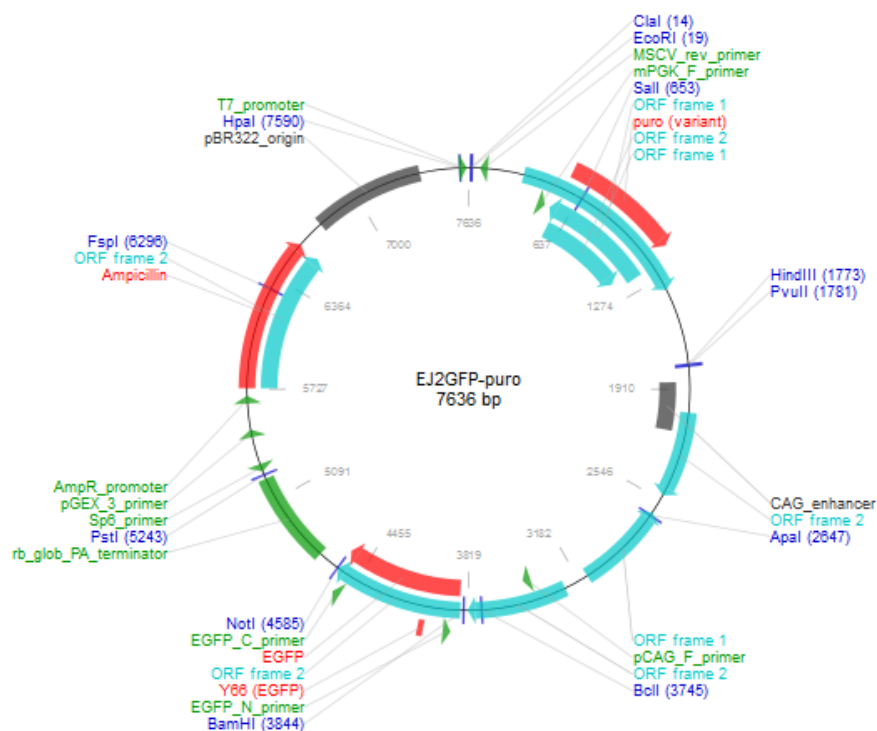
#### **4.1.4 Plazmidy**

Pro transfekci buněčných linií byl použit plazmid pCMV-i-SceI (3 117 ng/μl, čistota 1,9, rezistence Amp) získán od M. Jasin z vědeckého pracoviště Memorial Sloan Kettering Cancer Center, NY, USA, pCS2RFP (1 ng/μl, rezistence Amp) a reportéry EJ5-GFP

a EJ2-GFP (viz popis v kapitole 2.4.7), které byly dar od J. Starka z vědeckého pracoviště Beckman Research Institute of City of Hope, Duarte, CA, USA.



**Obrázek č. 11:** Mapa plazmidu EJ5-GFP (Zdroj <https://www.addgene.org/44026/>)



Obrázek č. 12: Mapa plazmidu EJ2-GFP (Zdroj <https://www.addgene.org/44025/>)

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Kultivace a pasážování linií

Buňky byly pěstovány v kultivačních lahvích v inkubátoru zajišťujícím teplotu 37 °C, vysokou vlhkost a 5% CO<sub>2</sub> s 10 ml kultivačního média DMEM, obohaceného o penicilin (100 U/ml), streptomycin (100 U/ml) a FBS 10% (v/v). V těchto podmínkách byly inkubovány až do dosažení 80 – 90% konfluency (asi 2 – 3 dny) a poté byly pasážovány. Z lahve bylo odsáto médium, buňky se promyly 1 ml 1 x PBS a přidaly se 2 ml trypsinu pro rozvolnění adherentních vazeb. Buňky s trypsinem byly inkubovány 3 – 8 min, dokud se neuvolnily ze dna nádoby. Proces uvolnění byl kontrolován pod mikroskopem. Působení trypsinu bylo zastaveno přidávkem média, buňky byly resuspendovány, potřebné procento suspenze bylo odebráno a k buňkám bylo doplněno čerstvé médium. Pasážování bylo prováděno 2x – 3x týdně, v závislosti na rychlosti růstu buněk.

## 4.2.2 Rozmražení a zamražení buněk

Buněčné linie U2OS a HEK293T jsou skladovány při nízkých teplotách (-80 °C). Pro rychlé rozmražení byly buňky po vytažení z mrazáku ponechány pod vlažnou tekoucí vodou, dokud suspenze nezkapalněla. Rozmražené buňky byly nasáty do pipety, spolu se 4 ml kultivačního média DMEM, předeřhátého na 37 °C. Tato suspenze byla v 12ml centrifugační zkumavce stočena při 200 x g a pokojové teplotě po dobu 5 min. Byl odsát supernatant a pelet byl resuspendován v 10 ml kultivačního média a přenesen do kultivační lahve. Pro zamrazení byla odebrána zbylá suspenze při procesu pasážování buněk a stočena na centrifuze při 200 x g, při pokojové teplotě po dobu 5 min ve 12ml centrifugační zkumavce. Supernatant byl odsát, buněčný pelet byl resuspendován v 6 ml média tvořeného 10% DMSO (v/v) v FBS a rozdělen po 1,5 ml do kryozkumavek. Ty byly obaleny několika vrstvami papíru, zabaleny do rukavice a umístěny do mrazáku s teplotou -80 °C.

## 4.2.3 Počítání hustoty buněčné suspenze

Bürkerova komůrka je tvořena silným podložním sklem s vyrytou počítací sítí, definovanou přesnou velikostí plochy a hloubkou. Počet buněk se odečítá v síti tvořené 9 velkými čtverci, rozdělenými do 16 menších. Plocha většího čtverce je 1 mm<sup>2</sup>. Mezi podložní a krycí sklo bylo nanášeno 10 µl suspenze odebrané při pasážování buněk. Komůrka byla vložena pod světlený mikroskop a byl spočítán počet buněk ve 3 velkých čtvercích. Zahrnovány byly buňky uvnitř čtverců a ty, které se dotýkaly pouze horní a dolní strany čtverce. Z výsledného počtu byl vypočítán aritmetický průměr a číslo bylo vynásobeno 10<sup>4</sup>. Takto byl zjištěn počet buněk v 1 ml.

Buňky byly počítány také přístrojem Vi-Cell XR BECKMAN COULTER. Z buněčné suspenze odebrané při procesu pasážování byl odebrán vzorek o objemu 1 ml do 1,5ml mikrozukavky. Tento byl vložen do přístroje Vi-Cell XR BECKMAN COULTER pro analýzu buněčné viability a po nastavení vhodných parametrů byla odečtena viabilita buněk v 1 ml.

## 4.2.4 Transfekce buněčných linií

Ze suspenze buněk odebrané při pasážování bylo do 6cm Petriho misky s 5 ml kultivačního média vysazeno 200 000 nebo 500 000 buněk. Ty byly inkubovány po dobu

24 hod v inkubátoru. Poté byly buňky podle návodu od výrobce transfekovány 5 µg plazmidů prostřednictvím reagentu ICAfectin 451 resp. FuGENE HD Transfection Reagent.

#### **4.2.5 Tvorba stabilní linie s reportérem EJ2 elektroporací**

Bylo spočítáno množství buněk v 1 ml suspenze odebrané při pasážování buněčné linie U2OS. Zbytek suspenze (9 ml) byl stočen na centrifuze při 200 x g při pokojové teplotě po dobu 10 min. Supernatant byl odsát a pelet resuspendován v 10 ml 1 x PBS a opět stočen. Po odsátí supernatantu bylo přidáno množství PBS, odpovídající koncentraci  $2 \times 10^6$  buněk ve 100 µl 1 x PBS. Z této suspenze bylo odebráno 100 µl do elektroporační kyvety a k nim přidáno 2,5 µg plazmidu. Kyveta byla vložena do přístroje Amaxa Nucleofector a byla provedena transfekce buněk plazmidem při nastavení, které bylo specifické pro danou linii. Následně bylo do kyvety přidáno 500 µl přehřátého média a vše bylo Pasteurovou pipetou odebráno a přidáno k 1 ml média v 12ti jamkovém panelu. Po 24 hodinách bylo do média přidáno 5 µg/ml puromycinu. Po 3 dnech byly buňky vysazeny na 10cm Petriho misku do 10 ml média s 5 µg/ml puromycinu a inkubovány až do vzniku dostatečně velkých kolonií (asi 13 dnů).

#### **4.2.6 Sběr kolonií reportérových linií**

Po době nutné k tvorbě kolonií bylo z buněk odsáto médium a jednotlivé klony byly označeny fixou. Buňky byly na 10 s zalaty roztokem 5 mmol/l EDTA 1 x PBS. Po odsátí EDTA bylo opatrně přidáno 10 ml 1 x PBS a 100µl pipetou odebírány jednotlivé klony vždy do 1 ml média s 5 µg/ml puromycinu v 12ti jamkových panelech. Po 9 dnech bylo z panelů vysazeno 5 nejnarostenějších klonů z obou reportérových linií do kultivačních lahví T-75 s 10 ml kultivačního média a 5 µg/ml puromycinu.

#### **4.2.7 siRNA transfekce**

Bylo vysazeno 500 000 buněk do 5 ml média v 6cm Petriho misce a ty byly inkubovány 24 hod. Po uplynutí této doby byla podle návodu od výrobce provedena transfekce buněk 2 µl 100 mmol/l siRNA prostřednictvím 10 µl Lipofectamin 2000. V případě potřeby byly buňky transfekované DNA pomocí ICAfectin 451 dle výše uvedeného postupu.

#### **4.2.8 Měření na průtokovém cytometru**

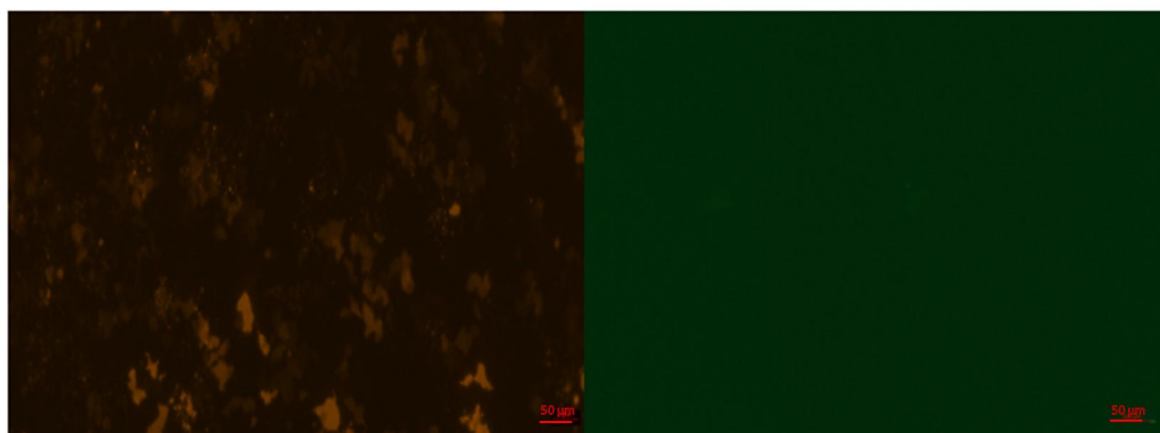
Postup přípravy buněčné suspenze pro měření byl shodný s postupem pasážování buněk uvedeným výše, na závěr byly buňky resuspendovány v 1 ml média a měřeny průtokovým cytometrem. Exprese I-SceI v buňkách byla vyjádřena expresí RFP. Pro analýzu přítomnosti RFP byl použit excitační laser o vlnové délce 561 nm a následnou detekcí emitované fluorescence o vlnových délkách 600 – 620 nm byl RFP kvantifikován. Detekce oprav byla založena na kvantifikaci GFP, která byla stanovena po excitaci laserem o vlnové délce 488 nm a následné detekci emitovaného fluorescenčního signálu o vlnových délkách 510 – 550 nm.



## 5 Výsledky

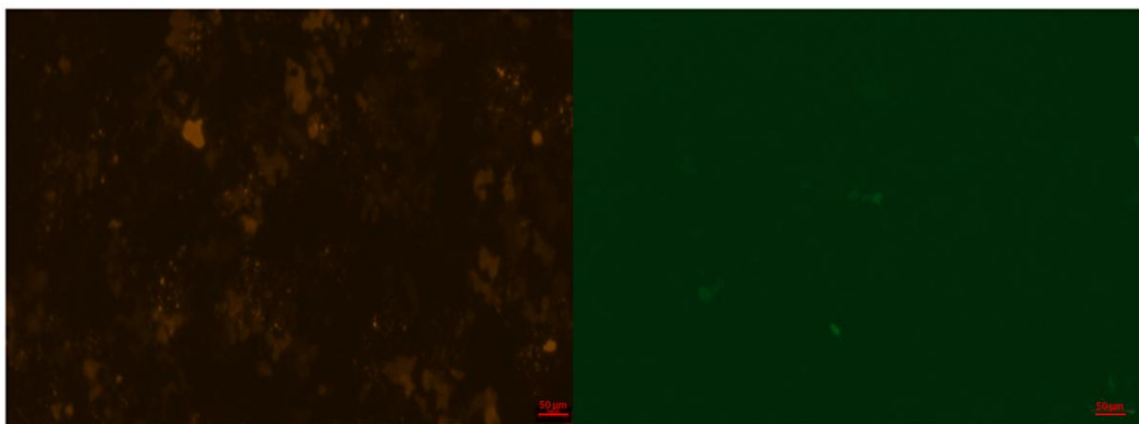
### 5.1 Detekce aNHEJ v reportérové linii U2OS-EJ2

Buněčná linie U2OS-EJ2 byla vytvořena pro měření událostí aNHEJ. Pro kontrolu úspěšnosti transfekce byl společně s endonukleázou I-SceI do buněk transfekován RFP. Buňky byly pozorovány na fluorescenčním mikroskopu. Zatímco exprese RFP byla viditelná asi u 70 % buněk, exprese GFP byla velmi slabá a zaznamenána u méně než 1 % úspěšně transfekovaných buněk (viz obrázek č. 13).

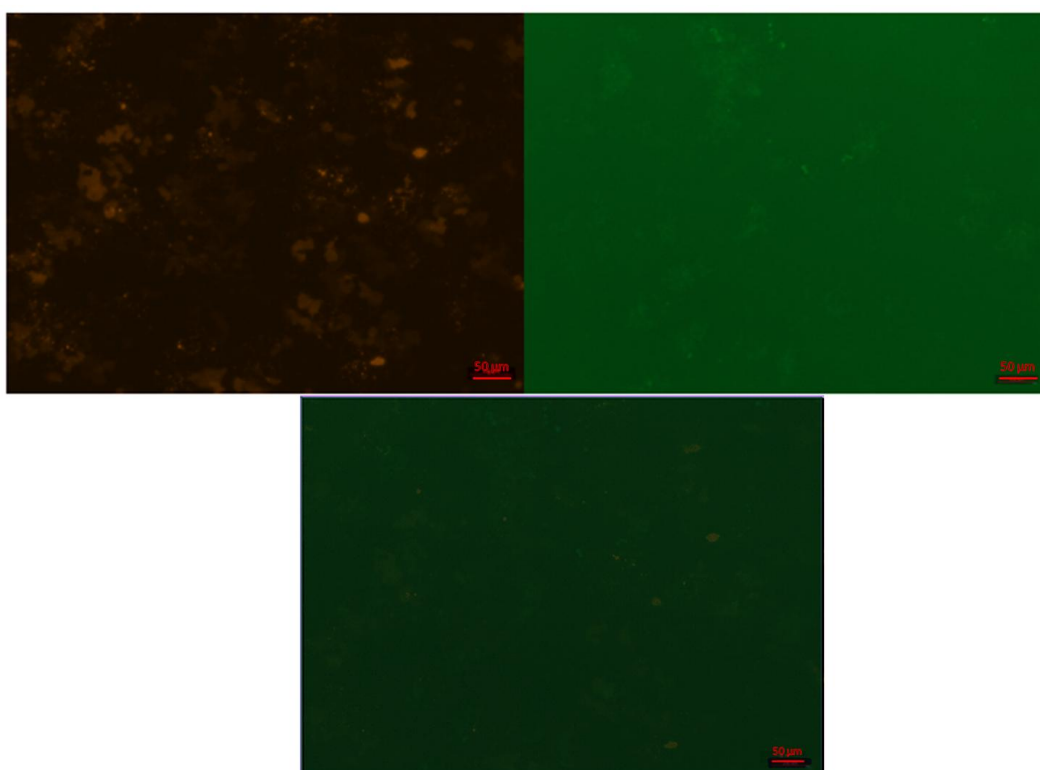


**Obrázek č. 13:** Fluorescenční detekce exprese RFP, udávající úspěšnost transfekce I-SceI (vlevo) a GFP, zobrazující události aNHEJ (vpravo) u linie U2OS-EJ2. Zvětšení 100x, měřítko 50 µm.

Kvůli slabé expresi GFP ručně vytvořené reportérové linie U2OS-EJ2, byla testována linie U2OS, která byla transfekována reportérem EJ2 pomocí elektroporačního systému Amaxa Nucleofector po vzoru Bennardo a kol. (2008). Navíc byl testovaný *knock-down* Ku86, což sloužilo jako pozitivní kontrola, protože se konce DSBs uvolnily pro vazbu PARP1, čímž mělo dojít k nárůstu aNHEJ. Exprese RFP byla jak u testovaných buněk, tak u pozitivní kontroly pozorována asi v 60 % (viz obrázek č. 14 a 15). Naopak exprese GFP byla v obou případech opět velmi slabá. U testované linie sice byly pozorovány buňky se silnější expresí GFP (viz obrázek č. 14 a č. 15), ovšem překryv s RFP kanálem u buněk s *knock-downem* Ku ukázal, že se spíše než o události aNHEJ, jednalo o artefakty v pozadí (viz obrázek č. 15), a díky tomu nebylo možné zaznamenat předpokládaný nárůst aNHEJ.



**Obrázek č. 14:** Fluorescenční detekce exprese RFP, udávající úspěšnost transfekce I-SceI (vlevo) a GFP, zobrazující události aNHEJ (vpravo) u linie U2OS-EJ2, vytvořené elektroporací. Zvětšení 100x, měřítko 50 μm.



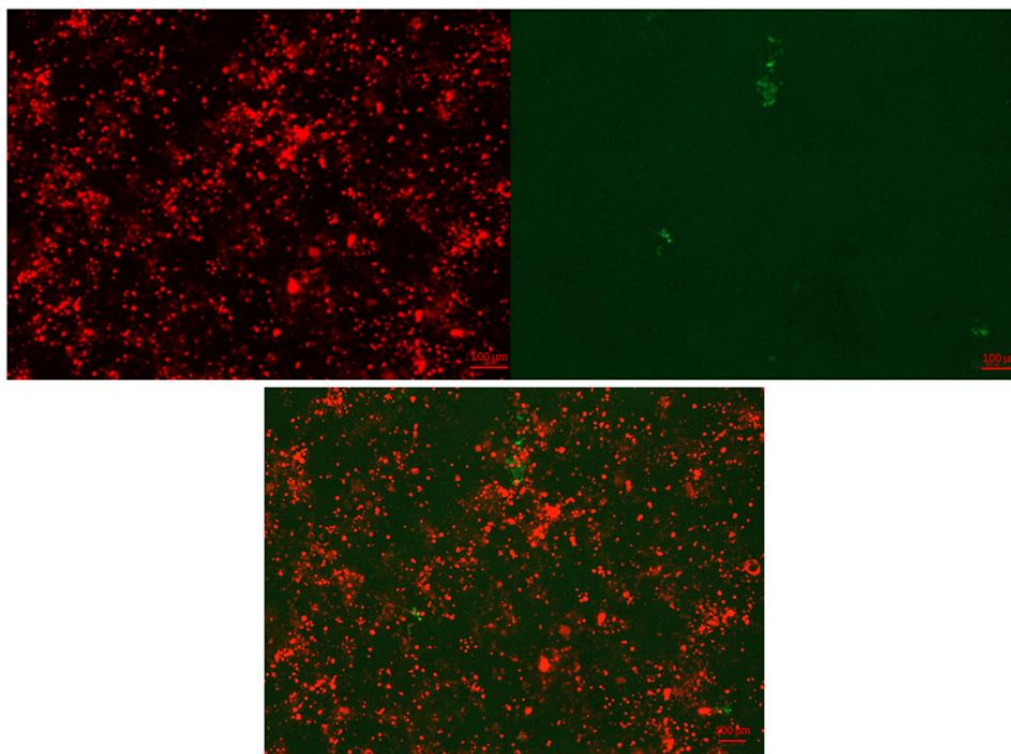
**Obrázek č. 15:** Fluorescenční detekce exprese RFP, udávající úspěšnost transfekce I-SceI (vlevo), GFP zobrazující události aNHEJ (vpravo) a překryv obou signálů (dole) u linie U2OS-EJ2, vytvořené elektroporací, s inhibicí Ku. Zvětšení 100x, měřítko 50 μm.

## 5.2 Detekce opravy aNHEJ a její ovlivnění inhibicí enzymu PARP1 v reportérové linii HEK293T-EJ2

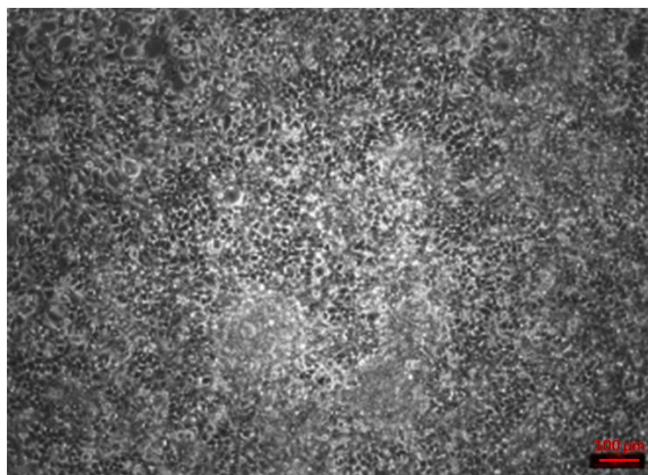
Vzhledem k neúspěšné detekci aNHEJ v linii U2OS a faktu, že Bennardo a kol. (2008) využívali ve svých experimentech linii HEK293T, byla pro další experimenty zvolena právě tato linie.

Buňky HEK293T-EJ2 byly plazmidem nesoucím endonukleázou I-SceI transfekovány použitím FuGENE HD Transfection Reagent. Na fluorescenčním mikroskopu byla zaznamenána úspěšnost transfekce asi 80 %, jak ukazuje míra svítivosti RFP (viz obrázek č. 16). U linie byla zaznamenána viditelná míra exprese GFP a překryv s RFP kanálem prokázal, že se jednalo o události aNHEJ (viz obrázek č. 16).

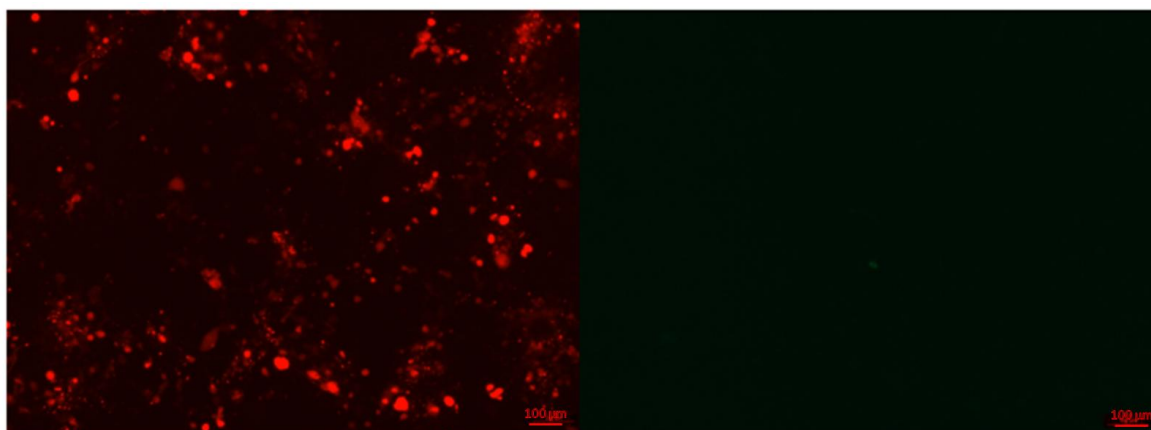
V reportérové linii byla také pozorována míra událostí aNHEJ po inhibici enzymu PARP1 (1  $\mu\text{mol/l}$ ). Inhibice PARP způsobila úbytek přeživších buněk (viz obrázek č. 17 a č. 19). Efektivita transfekce po inhibici nebyla výrazně ovlivněna. Jak ukazuje exprese RFP, pohybovala se kolem 60 %, ovšem exprese GFP byla opět velmi slabá (viz obrázek č. 18).



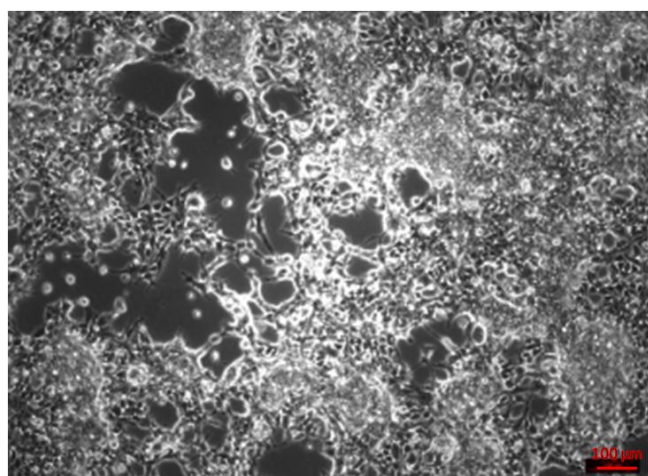
**Obrázek č. 16:** Fluorescenční detekce exprese RFP, udávající úspěšnost transfekce I-SceI (vlevo), GFP zobrazující události aNHEJ (vpravo) a překryv obou signálů (dole) u linie HEK293T-EJ2. Zvětšení 50x, měřítko 100  $\mu\text{m}$ .



**Obrázek č. 17:** Pokrytí plochy buňkami linie HEK293T-EJ2 bez inhibice enzymu PARP1. Zvětšení 50x, měřítko 100 μm.

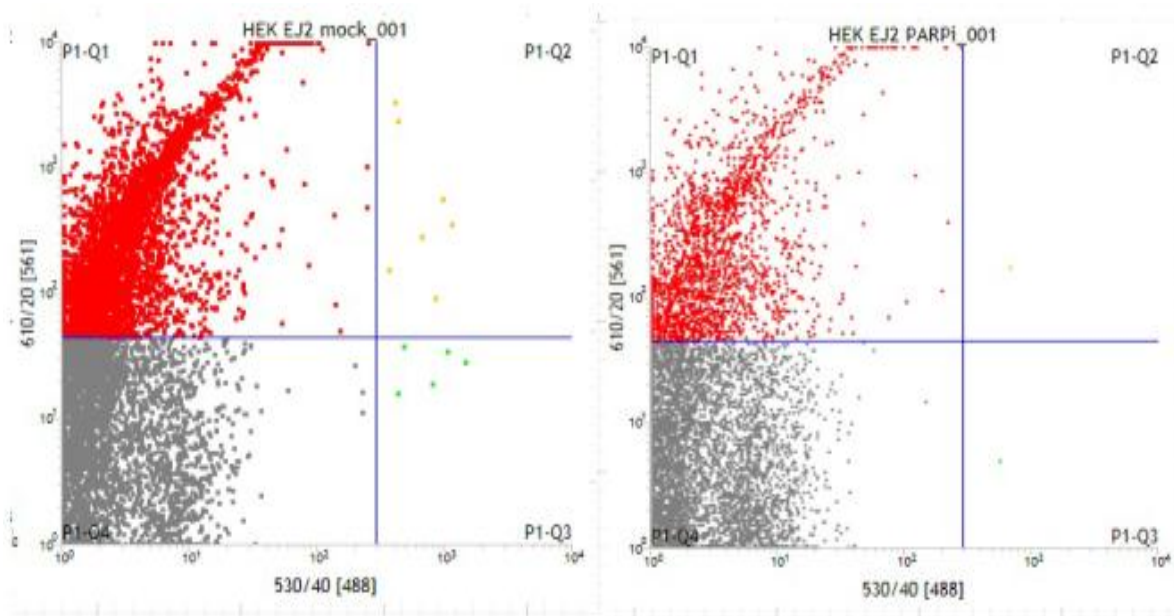


**Obrázek č. 18:** Fluorescenční detekce exprese RFP, udávající úspěšnost transfekce I-SceI (vlevo) a GFP, zobrazující události aNHEJ (vpravo) u linie HEK293T-EJ2 s inhibicí PARP1. Zvětšení 50x, měřítko 100 μm.



**Obrázek č. 19:** Pokrytí plochy buňkami linie HEK293T-EJ2 s inhibicí enzymu PARP1. Zvětšení 50x, měřítko 100 μm.

Buňky byly, kvůli slabé expresi GFP detekované fluorescenčním mikroskopem, měřeny na průtokovém cytometru. Pokus byl proveden ve 3 opakováních a průměrné hodnoty byly zpracovány. Cytometr zaznamenal velké množství buněk s expresí RFP, ale buňky exprimující současně RFP i GFP, tedy ty, v nichž proběhl aNHEJ, byly ve velmi nízkých počtech (viz obrázek č. 20).



**Obrázek č. 20:** Porovnání událostí aNHEJ bez (vlevo) a s inhibicí enzymu PARP1 (vpravo) na záznamu z průtokového cytometru. Kvadrant P1-Q1 zaznamenává buňky s expresí RFP, kvadrant P1-Q2 buňky s expresí RFP i GFP – události aNHEJ a kvadrant P1-Q3 buňky s expresí GFP.

Výsledky naznačují pokles opravy zprostředkované aNHEJ při inhibici enzymu PARP1 a zaznamenaný medián poukazuje na sníženou míru intenzity signálu buněk po inhibici (tabulka č. II). Ovšem tyto události byly z počtu měřených 10 000 buněk ve vzorku zaznamenány v průměru jen u 6 a 9 buněk, z čehož nelze vyvozovat statisticky podložené závěry.

**Tabulka č. II:** Průměrné hodnoty událostí aNHEJ, naměřené z 10 000 buněk v jednotlivých vzorcích na průtokovém cytometru. EJ2 mock značí linii HEK293T-EJ2 a EJ2 PARPi udává tutéž linii, u které byl inhibován enzym PARP1.

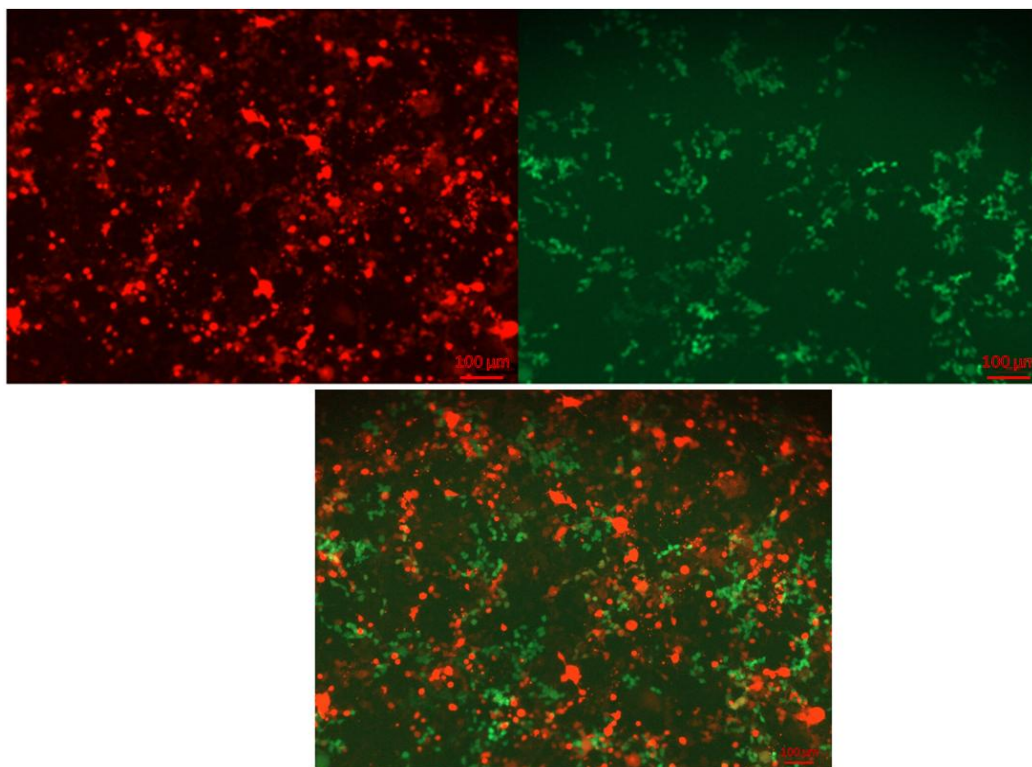
	Události aNHEJ	Události aNHEJ v %	Medián intenzity signálu
<b>EJ2 mock</b>	9	0,08	421
<b>EJ2 PARPi</b>	6	0,0333	154

### **5.3 Detekce opravy NHEJ a její ovlivnění inhibicí enzymu PARP1 v reportérové linii HEK293T-EJ5**

Pro bližší zjištění vlivu inhibice enzymu PARP1 na opravu aNHEJ byl proveden pokus, který měl zaznamenat ovlivnění celkové NHEJ touto inhibicí.

Buňky HEK293T-EJ5 byly plazmidem nesoucím endonukleázu I-SceI transfekovány použitím FuGENE HD Transfection Reagent. Fluorescenčně detekovaná transfekce buněk měla asi 90% úspěšnost, jak prokazuje exprese RFP (viz obrázek č. 21). Exprese GFP byla asi v 60 % případů a překryv s RFP kanálem prokázal, že se jedná o transfekované buňky. Zároveň bylo možné pozorovat, že buňky s vysokou expresí GFP měly naopak velmi slabou expresi RFP (viz obrázek č. 21).

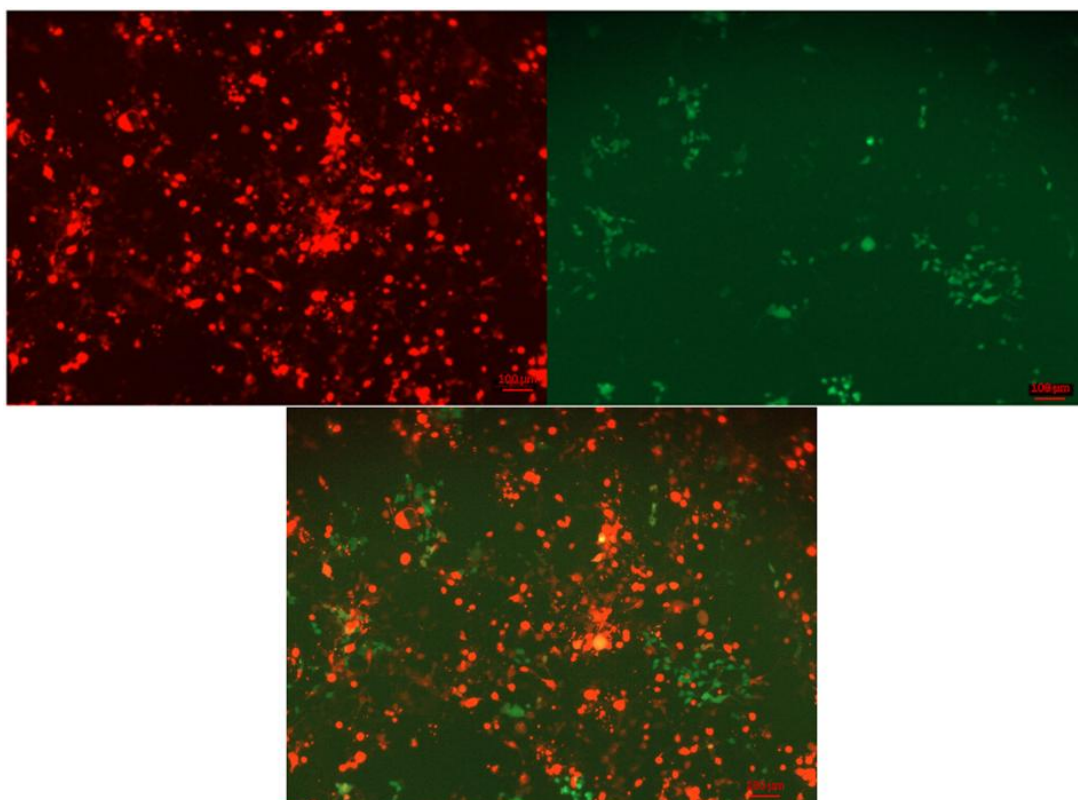
Na linii HEK293T-EJ5 byl testován vliv inhibice enzymu PARP1 v koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$  na opravu NHEJ. Byl zaznamenán pokles účinnosti transfekce. RFP se exprimovalo asi v 70 % buněk (viz obrázek č. 23). Exprese GFP po inhibici PARP1 výrazně poklesla, a taktéž byla pozorována snížená míra intenzity signálu buněk. Po překryvu RFP kanálem pro průkaznost exprese GFP u transfekovaných buněk bylo opět zaznamenáno, že buňky exprimující GFP v důsledku aktivace reportéru vykazují velmi slabou expresi RFP (viz obrázek č. 23). Opět byl pozorován mírný pokles přeživších buněk s inhibitorem PARP1 (viz obrázek č. 22 a č. 24).



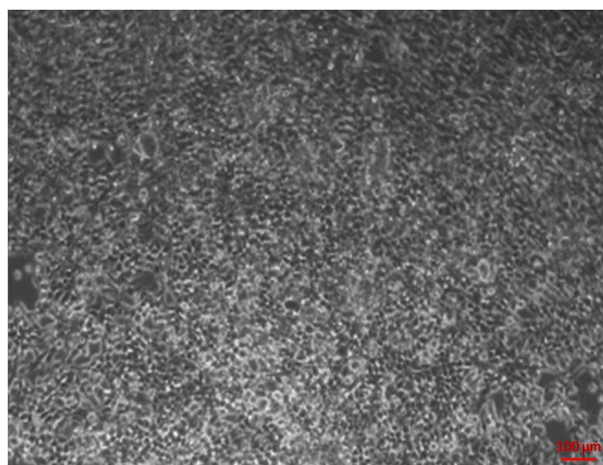
**Obrázek č. 21:** Fluorescenční detekce exprese RFP, udávající úspěšnost transfekce I-SceI (vlevo), GFP zobrazující události NHEJ (vpravo) a překryv obou signálů (dole) u linie HEK293T-EJ5. Zvětšení 50x, měřítko 100 µm.



**Obrázek č. 22:** Pokrytí plochy buňkami linie HEK293T-EJ5 bez inhibice enzymu PARP1. Zvětšení 50x, měřítko 100 µm.



**Obrázek č. 23:** Fluorescenční detekce exprese RFP, udávající úspěšnost transfekce I-SceI (vlevo), GFP zobrazující události NHEJ (vpravo) a překryv obou signálů (dole) u linie HEK293T-EJ5 s inhibicí PARP1. Zvětšení 50x, měřítko 100 µm.

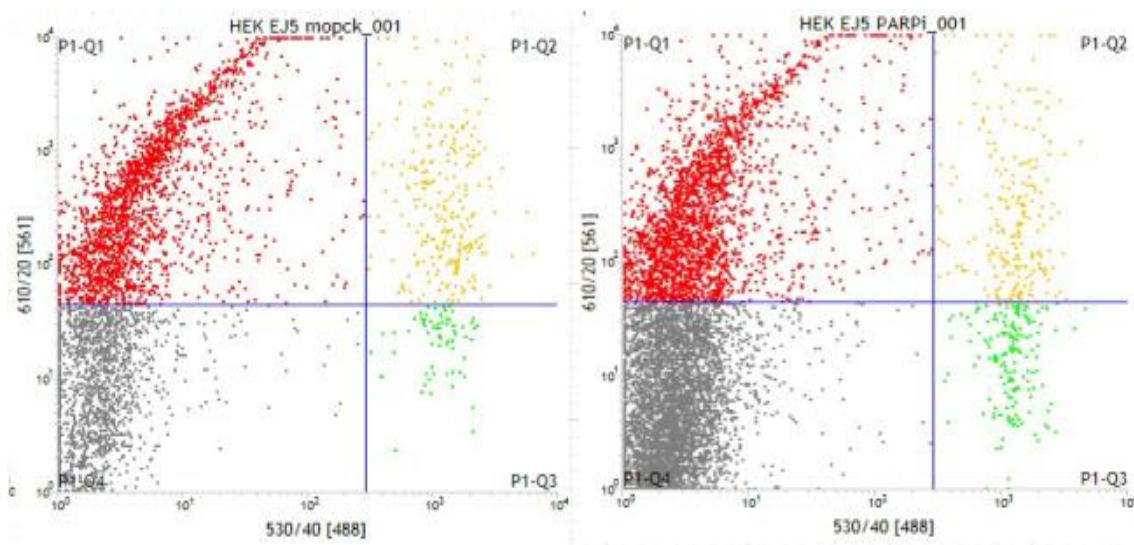


**Obrázek č. 24:** Pokrytí plochy buňkami linie HEK293T-EJ5 s inhibicí enzymu PARP1. Zvětšení 50x, měřítko 100 µm.

Pro detailnější stanovení míry NHEJ a jeho ovlivnění inhibicí PARP1, byly buňky analyzovány na průtokovém cytometru. Pokus byl proveden ve 3 opakováních a průměrné hodnoty byly zpracovány. Záznam z cytometru potvrdil vysokou úspěšnost transfekce, a také

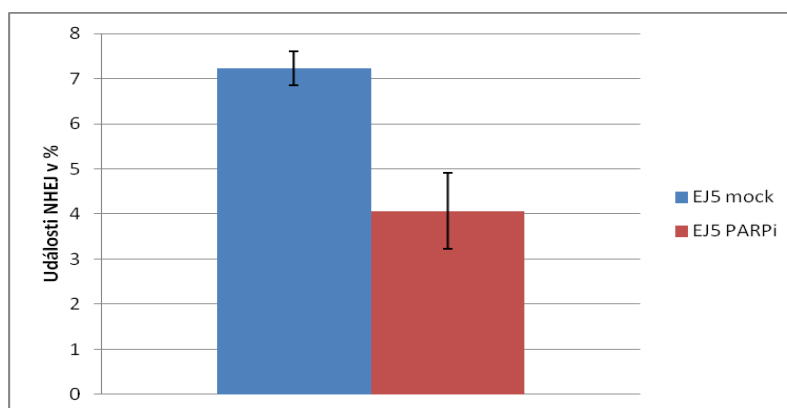


mnoho zaznamenaných událostí NHEJ jak bez, tak s inhibicí PARP1. U buněk s inhibicí PARP1 bylo těchto událostí méně (viz obrázek č. 25).

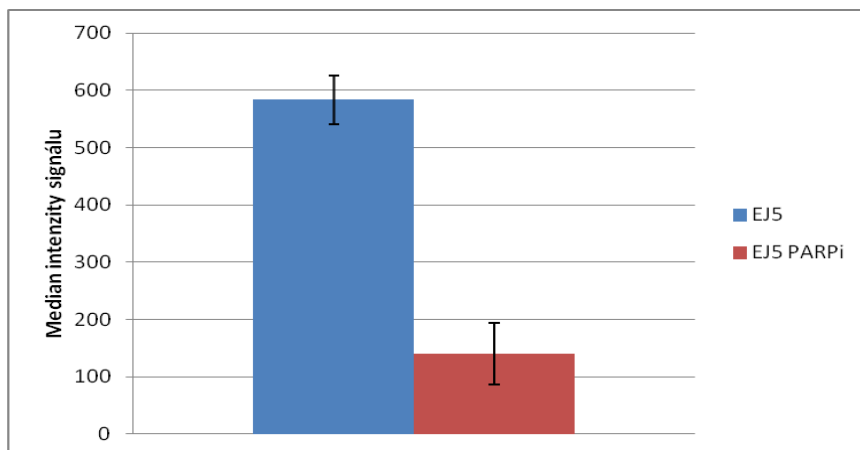


**Obrázek č. 25:** Porovnání událostí NHEJ bez (vlevo) a s inhibicí enzymu PARP1 (vpravo) na záznamu z průtokového cytometru. Kvadrant P1-Q1 zaznamenává buňky s expresí RFP, kvadrant P1-Q2 buňky s expresí RFP i GFP – události aNHEJ a kvadrant P1-Q3 buňky s expresí GFP.

Analýza z průtokového cytometru byla vyhodnocována z 10 000 buněk v každém měřeném vzorku. Průměrné hodnoty měření ukázaly, že inhibice PARP1 má velký vliv na potlačení NHEJ. GFP pozitivita značící NHEJ událost byla u kontroly bez inhibitoru PARP1 zaznamenána v průměru u 7,23 % buněk, zatímco buňky s inhibicí PARP1 vykazovaly úroveň opravy jen v 4,065 % případech (viz graf č. 1). Průměrná intenzita signálu buněk po inhibici PARP1 klesla z 584 na 141 (viz graf č. 2).



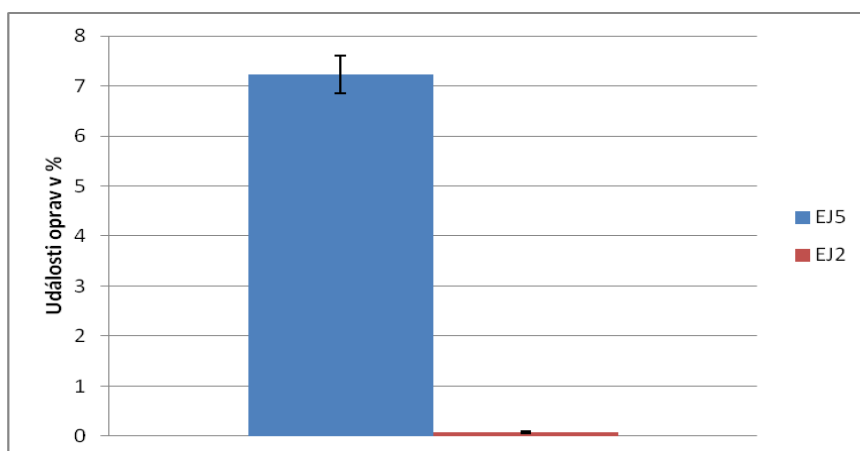
**Graf č. 1:** Srovnání průměrného procentuálního výskytu událostí NHEJ bez (modrý sloupec) a s inhibicí PARP1 (červený sloupec).



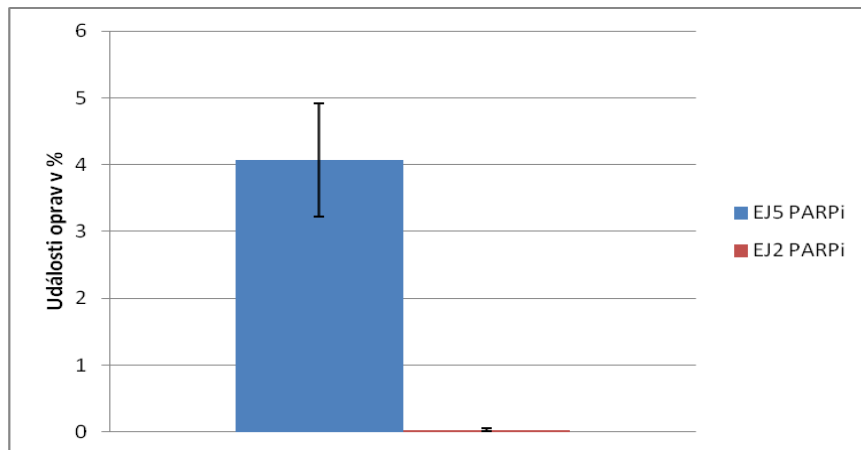
**Graf č. 2:** Srovnání průměrné intenzity signálu buněk se zaznamenanými událostmi NHEJ bez (modrý sloupec) a s inhibicí PARP1 (červený sloupec).

## 5.4 Zastoupení aNHEJ v celkovém NHEJ u linie HEK293T

Z průměrných hodnot z průtokového cytometru byla vyhodnocena hladina aNHEJ v rámci celkové NHEJ. Vyhodnocení ukázalo pouze 1% zastoupení opravy aNHEJ v rámci celkové NHEJ (viz graf č. 3), které po inhibici PARP1 pokleslo až na 0,7 % (viz graf č. 4).



**Graf č. 3:** Průměrné procentuální zastoupení událostí aNHEJ (červený sloupec) v rámci celkové NHEJ (modrý sloupec).



**Graf č. 4:** Průměrné procentuální zastoupení událostí aNHEJ (červený sloupec) v rámci celkové NHEJ (modrý sloupec) po inhibici PARP1.

## 6 Diskuze

Cílem praktické části bakalářské práce bylo zjistit vliv inhibice enzymu PARP1 na podíl alternativního spojování nehomologických konců v celkové opravě poškození DNA. Dráha spravuje dvouvláknové zlomy, které mohou být pro buňky letální. Právě alternativní dráha spojování nehomologických konců byla testována kvůli typickému výskytu v nádorových buňkách, a také proto, že je stále neprobádanou oblastí, což z ní dělá aktuální téma v rámci výzkumu odpovědi na poškození DNA. Úroveň aNHEJ již byla testována prostřednictvím dynamiky defosforylace  $\gamma$ H2AX (Audebert a kol., 2004), v této práci byl však vyzkoušen nový, prozatím netestovaný způsob, využívající fluorescenční reportéry.

Pro experiment byla nejprve vybrána linie U2OS, do které byl transfekcí vložen reportér EJ2, navržený pro měření aNHEJ (Bennardo a kol., 2008). U linie probíhala efektivní transfekce plazmidem s endonukleázou I-SceI, ovšem míru aNHEJ nebylo možné fluorescenčním mikroskopem zaznamenat, což by mohlo naznačovat velmi malé procento událostí aNHEJ v rámci oprav. Důvodem však mohla být také málo účinná transfekce linie reportérem EJ2. Kvůli tomu byla provedena transfekce U2OS reportérem EJ2 elektroporací po vzoru Bennardo a kol. (2008). Elektroporace umožňuje integraci reportéru s větší frekvencí, tedy potenciálně více událostí aNHEJ. Reportérová esej byla také testována v podmínkách *knock-downu* Ku80 prostřednictvím siRNA. Ku, enzym typický pro NHEJ, je známý svou kompeticí s PARP1, který je klíčovým komponentem aNHEJ (Wang a kol., 2006). V případě inhibice Ku je PARP1 přednostním enzymem vázajícím konce DSB, což vede ke zvýšení úrovně aNHEJ (Bennardo a kol. 2008). *Knock-down* Ku80 v buňkách s EJ2 reportérem měl tedy sloužit jako pozitivní kontrola funkce aNHEJ reportéru. Nicméně, události aNHEJ nebyly opět zaznamenány. Možným důvodem mohl být i chybně zvolený model – linie U2OS, která vykazuje vysokou míru oprav homologní rekombinací, což mohlo zastíňovat opravu prostřednictvím aNHEJ.

Vzhledem k nezachycené expresi GFP u buněk s aNHEJ reportérem v linii U2OS, byla jako další model použita linie HEK293T. Byla zvolena díky odlišnému průběhu buněčného cyklu ve srovnání s U2OS, vysoké míře exprese proteinů, tedy i GFP, a také proto, že byla použita autory reportéru (Bennardo a kol., 2008). U buněk linie HEK293T byla transfekce ICAfectinem 451 později nahrazena reagentem FuGENE HD Transfection Reagent, který vykazoval vyšší úspěšnost transfekce. Úrovně jednotlivých oprav byly pozorovány na fluorescenčním mikroskopu a následně měřeny na průtokovém cytometru, kde

byly jednotlivé kvadranty nastaveny tak, aby se měření vyvarovalo artefaktům. V linii bylo možné pozorovat zastoupení aNHEJ v celkové opravě buněk, i když ve velmi malém množství. Úspěšná detekce mohla být díky vlastnostem linie, mohla ji však ovlivnit také změna transfekčního reagentu. Úroveň aNHEJ byla následně testována za podmínek inhibice enzymu PARP1. Inhibice enzymu byla pro buňky toxická a zvyšovala úmrtnost kultivovaných buněk, proto byl inhibitor používán v nízké koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$ . Vzhledem k tomu, že vazba PARP1 na konce DSB je platformou pro ostatní proteiny opravy aNHEJ (Ko a Ren, 2012) lze předpokládat, že inhibice PARP1 potlačí tuto opravu a teoreticky by pokles oprav aNHEJ způsobený inhibicí PARP1 podporoval myšlenku vyšší úmrtnosti, ke které přispívá neschopnost nádorových buněk opravit dvouvláknové zlomy tímto mechanismem, popřípadě jinými dráhami, ve kterých působí PARP1. Dle očekávání úroveň aNHEJ po inhibici enzymu PARP1 sice výrazně poklesla, oprava však byla zaznamenána v průměru jen u necelé desítky buněk ze vzorku 10 000, z čehož nelze odvodit statisticky významný výsledek. Vzhledem k početným transfekcím s různými reagenty provedeným v mnoha opakováních, které vedly k neúspěšné expresi GFP, byla nedostatečná detekce aNHEJ pravděpodobně zapříčiněná nefunkčností reportéru EJ2. Alternativnou pro zlepšení výsledků by mohlo být použití fúzního iSceI-RFP plazmidu, místo plazmidů pCS2RFP a pCMV-i-SceI, popřípadě použití jiné metody transfekce reportérem. Alternativou je i využití jiného reportéru. I přes nepříliš směrodatné výsledky, celkový trend sleduje výsledky jiných vědeckých týmů, kteří taktéž pozorovali pokles aNHEJ (Audebert a kol., 2004).

Pokud by se prokázalo, že inhibice PARP1 potlačuje opravu aNHEJ, zůstává otázkou, zda zároveň bude potlačen celkový NHEJ, jelikož je aNHEJ jeho podskupina, nebo pokles povede ke zvýšení podílu NHEJ. Pokud Ku nebude mít partnera pro kompetici a konce DNA budou volné pro jeho vazbu, zahájí se navázání dalších proteinů účastnících se NHEJ. Ku má sice vyšší afinitu ke koncům DSB, PARP1 se však na DNA váže i v jeho přítomnosti, čímž snižuje množství konců DNA s navázaným Ku (Wang a kol., 2006). V případě inhibice PARP1 budou všechny tyto konce volné pro vazbu Ku, čímž by mohlo dojít k nárůstu NHEJ. Pro zodpovězení této otázky byla linie HEK293T testována také na zastoupení NHEJ v celkové opravě buněk a jeho ovlivnění inhibicí PARP1. Již mikroskopická fluorescenční detekce prokázala opravu NHEJ asi v 60 % buněk (viz obrázek č. 21). Inhibice enzymu PARP1 potom způsobila pokles NHEJ téměř o polovinu (viz graf č. 1), přičemž pokles pozorovala také práce Wang a kol. (2006). Jestliže se tedy odkážeme na výsledky ovlivnění aNHEJ inhibicí PARP1, experiment dokazuje, že inhibice PARP1 potlačuje aNHEJ v rámci

celkového NHEJ a nikoli ve prospěch NHEJ, popřípadě potlačuje klasický NHEJ. To značí výrazné zastoupení alternativní dráhy NHEJ v opravě buněk, může se však jednat i o doposud neznámou pozitivní regulaci NHEJ enzymem PARP1. Práce Beck a kol. (2014) tvrdí, že po inhibici PARP3, který použitý reportér dokáže také zachytit, narůstá podíl NHEJ. Dále Patel a kol. (2011) zjistili, že NHEJ má klíčovou roli v syntetické letalitě způsobené PARP inhibicí v HR deficientních buňkách, kde tato inhibice aktivuje NHEJ. Výsledky sice naznačují jen 1% zastoupení aNHEJ v rámci oprav NHEJ, což vypovídá ve prospěch role PARP1 v NHEJ, avšak kvůli pravděpodobné nefunkčnosti reportéru EJ2 nemohla být míra aNHEJ plně detekována. Oprava NHEJ je přednostní mechanismus opravy DSBs v normálních buňkách savců (Khanna a Jackson, 2011) a v případě, že by PARP1 ovlivňoval NHEJ, byla by léčba založená na inhibitech PARP škodlivá i pro tyto buňky. Vzhledem k tomu, že léčba nádorů inhibitory PARP se zdá být velmi nadějným postupem, měly by být prostudovány aspekty vlivu PARP na NHEJ.

V rámci experimentu bylo také zjištěno, že pokles fluorescenčního signálu reportéru EJ5 po inhibici PARP1 nekoresponduje s počtem naměřených událostí. To mohlo být způsobeno vlivem inhibice PARP1 na expresi GFP a RFP. Možným důvodem může být vliv PAR modifikace chromatinu na transkripci.

## 7 Závěr

PARP1 je zapojen v mnoha opravných dráhách, jestliže však jeho inhibice snižuje úroveň alternativního NHEJ, jeví se tato regulace jako účinný prostředek léčby nádorů. Zejména proto, že aNHEJ je typický hlavně pro nádorové buňky a jeho potlačení by tedy mohlo představovat dostatečně široké terapeutické okno. Cílem bakalářské práce bylo zjistit vliv PARP1 na tuto opravnou dráhu prostřednictvím specifického fluorescenčního reportéru.

Kvůli nedostatečné detekci exprese GFP, zapříčiněné pravděpodobně nefunkčností reportéru EJ2, nemohlo být ovlivnění alternativní dráhy spojování nehomologických konců inhibicí enzymu PARP1 prokazatelně zjištěno. Výsledky získané u linie HEK293T však alespoň naznačovaly, že inhibice způsobuje pokles aktivity této dráhy. Naopak bylo dokázáno, že inhibice PARP1 snižuje opravu zprostředkovanou spojováním nehomologických konců, a to téměř o polovinu. Vzhledem k těmto poznatkům se nabízí bližší analýza úrovně alternativní dráhy v rámci celkového spojování nehomologických konců, aby se prokázalo, zda inhibice PARP1 způsobila pokles NHEJ kvůli úbytku aNHEJ nebo kvůli přímému ovlivnění NHEJ enzymem PARP1.

## 8 Literatura

Audebert, M., Salles, B., Calsou, P. (2004): Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* 279, 55117-55126.

Bartos, J.D., Willmott, L.J., Binz, S.K., Wold, M.S., and Bambara, R.A. (2008): Catalysis of strand annealing by replication protein A derives from its strand melting properties. *J Biol Chem* 283, 21758-21768.

Beck, C., Boehler, C., Barbat, J.G., Bonnet, M.E., Illuzzi, G., Ronde, P., Gauthier, L.R., Magroun, N., Rajendran, A., Lopez, B.S., Scully, R., Boussin, F.D., Schreiber, V., Dantzer, F. (2014): PARP3 affects the relative contribution of homologous recombination and nonhomologous end-joining pathways. *Nucleic Acids Res.*

Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., Stark, J.M. (2008): Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet* 4, e1000110.

Bentley, J., Diggle, C.P., Harnden, P., Knowles, M.A., Kiltie, A.E. (2004): DNA double strand break repair in human bladder cancer is error prone and involves microhomology-associated end-joining. *Nucleic Acids Res* 32, 5249-5259.

Betermier, M., Bertrand, P., Lopez, B.S. (2014): Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS Genet* 10, e1004086.

Bothmer, A., Robbiani, D.F., Feldhahn, N., Gazumyan, A., Nussenzweig, A., Nussenzweig, M.C. (2010): 53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination. *J Exp Med* 207, 855-865.

Bunting, S.F., Callen, E., Wong, N., Chen, H.T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., Xu, X., Deng, C. X., Finkel, T., Nussenzweig, M., Stark, J.M., Nussenzweig, A. (2010): 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* 141, 243-254.

Burkle, A., Virag, L. (2013): Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes. *Mol Aspects Med* 34, 1046-1065.

Byrne, M., Wray, J., Reinert, B., Wu, Y., Nickoloff, J., Lee, S.H., Hromas, R., Williamson, E. (2014): Mechanisms of oncogenic chromosomal translocations. *Ann N Y Acad Sci.*

Daley, J.M., Sung, P. (2014): 53BP1, BRCA1 and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol.*



- Dantzer, F., Ame, J.C., Schreiber, V., Nakamura, J., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G. (2006): Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair. *Methods Enzymol* 409, 493-510.
- Davar, D., Beumer, J.H., Hamieh, L., Tawbi, H. (2012): Role of PARP inhibitors in cancer biology and therapy. *Curr Med Chem* 19, 3907-3921.
- Davis, A.J., Chen, D.J. (2013): DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res* 2, 130-143.
- Dedes, K.J., Wilkerson, P.M., Wetterskog, D., Weigelt, B., Ashworth, A., Reis-Filho, J.S. (2011): Synthetic lethality of PARP inhibition in cancers lacking BRCA1 and BRCA2 mutations. *Cell Cycle* 10, 1192-1199.
- Della-Maria, J., Zhou, Y., Tsai, M.S., Kuhnlein, J., Carney, J.P., Paull, T.T., Tomkinson, A.E. (2011): Human Mre11/human Rad50/Nbs1 and DNA ligase IIIalpha/XRCC1 protein complexes act together in an alternative nonhomologous end joining pathway. *J Biol Chem* 286, 33845-33853.
- Ding, D.Q., Haraguchi, T., Hiraoka, Y. From meiosis to postmeiotic events: alignment and recognition of homologous chromosomes in meiosis. (2010): *FEBS J* 277, 565-570.
- Dinkelmann, M., Spehalski, E., Stoneham, T., Buis, J., Wu, Y., Sekiguchi, J.M., Ferguson, D.O. (2009): Multiple functions of MRN in end-joining pathways during isotype class switching. *Nat Struct Mol Biol* 16, 808-813.
- Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H., Alt, F.W. (2005): Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv Immunol* 86, 43-112.
- Dueva, R., Iliakis, G. (2013): Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Transl Cancer Res* 2013;2(3):163-177
- Esteban, V., Martin, M.J., Blanco, L. (2013): The BRCT domain and the specific loop 1 of human Polmu are targets of Cdk2/cyclin A phosphorylation. *DNA Repair (Amst)* 12, 824-834.
- Featherstone, C., Jackson, S.P. (1999): Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutat Res* 434, 3-15.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Schultz, Wood, R.D., Schultz, R.A., Ellenberger, T. (2006): *DNA repair and mutagenesis* (2nd ed.). ASM Press. ISBN 978-1-55581-319-2.
- Frit, P., Barboule, N., Yuan, Y., Gomez, D., Calsou, P. (2014): Alternative end-joining pathway(s): Bricolage at DNA breaks. *DNA Repair (Amst)*.
- Garner, E., Kim, Y., Lach, F.P., Kottemann, M.C., Smogorzewska, A. (2013): Human GEN1 and the SLX4-Associated Nucleases MUS81 and SLX1 Are Essential for the Resolution of Replication-Induced Holliday Junctions. *Cell Rep* 5, 207-215.

Grabarz, A., Guirouilh-Barbat, J., Barascu, A., Pennarun, G., Genet, D., Rass, E., Germann, S.M., Bertrand, P., Hickson, I.D., Lopez, B.S. (2013): A role for BLM in double-strand break repair pathway choice: prevention of CtIP/Mre11-mediated alternative nonhomologous end-joining. *Cell Rep* 5, 21-28.

van Gent, D.C., van der Burg, M. (2007): Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene* 26, 7731-7740.

Gunn, A., Stark, J.M. (2012): I-SceI-based assays to examine distinct repair outcomes of mammalian chromosomal double strand breaks. *Methods Mol Biol* 920, 379-391.

Helleday, T. (2011): The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Mol Oncol* 5, 387-393.

Huertas, P. (2010): DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol* 17, 11-16.

Hunter, N., Kleckner, N. (2001): The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell* 106, 59-70.

Jackson, S.P., Bartek, J. (2009): The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071-1078.

Kaelin, W.G., Jr. (2005): The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 5, 689-698.

Khanna, K.K., Jackson, S.P. (2001): DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27, 247-254.

Ko H. L., Ren E. C. (2012): Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription *Biomolecules*, 2, 524-548; doi:10.3390/biom2040524

Kumar, R., Cheok, C.F. (2014): RIF1: A novel regulatory factor for DNA replication and DNA damage response signaling. *DNA Repair (Amst)* 15, 54-59.

Lees-Miller, S.P., Meek, K. (2003): Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* 85, 1161-1173.

Li, L., Robert, C., Rassool, F.V. (2011): The Role of Error-Prone Alternative Non-Homologous End-Joining in Genomic Instability in Cancer, DNA Repair and Human Health, Dr. Sonya Vengrova (Ed.), ISBN:978-953-307-612-6, InTech

Lieber, M.R. (2008): The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* 283, 1-5.

Lieber, M.R. (2010): The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* 79, 181-211.

Lieber, M.R., Gu, J., Lu, H., Shimazaki, N., Tsai, A.G. (2010): Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. *Subcell Biochem* 50, 279-296.

Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. (2003): Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 712-720.

Mahaney, B.L., Hammel, M., Meek, K., Tainer, J.A., Lees-Miller, S.P. (2013): XRCC4 and XLF form long helical protein filaments suitable for DNA end protection and alignment to facilitate DNA double strand break repair. *Biochem Cell Biol* 91, 31-41.

Mansour, W.Y., Borgmann, K., Petersen, C., Dikomey, E., Dahm-Daphi, J. (2013): The absence of Ku but not defects in classical non-homologous end-joining is required to trigger PARP1-dependent end-joining. *DNA Repair (Amst)* 12, 1134-1142.

Mazzarelli, P., Rabitti, C., Parrella, P., Seripa, D., Persichetti, P., Marangi, G.F., Perrone, G., Poeta, M.L., Delfino, M., Fazio, V.M. (2003): Differential modulation of Ku70/80 DNA-binding activity in a patient with multiple basal cell carcinomas. *J Invest Dermatol* 121, 628-633.

Miller, O. J., Therman, E. (2001): Human chromosomes (4th ed.). New York : Springer, 501

Mladenov, E., Iliakis, G. (2011): Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res* 711, 61-72.

Mohammadinejad, P., Abolhassani, H., Aghamohammadi, A., Pourhamdi, S., Ghosh, S., Sadeghi, B., Nasiri Kalmarzi, R., Durandy, A., Borkhardt, A. (2014): CLASS SWITCH RECOMBINATION PROCESS IN ATAXIA TELANGIECTASIA PATIENTS WITH ELEVATED SERUM LEVELS OF IgM. *J Immunoassay Immunochem*.

Moon, A.F., Pryor, J.M., Ramsden, D.A., Kunkel, T.A., Bebenek, K., Pedersen, L.C. (2014): Sustained active site rigidity during synthesis by human DNA polymerase  $\mu$ . *Nat Struct Mol Biol*.

Muñoz-Galván, S., Lopez-Saavedra, A., Jackson, S.P., Huertas, P., Cortes-Ledesma, F., Aguilera, A. (2013): Competing roles of DNA end resection and non-homologous end joining functions in the repair of replication-born double-strand breaks by sister-chromatid recombination. *Nucleic Acids Res* 41, 1669-1683.

Murai, J., Zhang, Y., Morris, J., Ji, J., Takeda, S., Doroshov, J.H., Pommier, Y.G. (2014): Rationale for PARP inhibitors in combination therapy with camptothecins or temozolomide based on PARP trapping versus catalytic inhibition. *J Pharmacol Exp Ther*.

Negritto, M. C. (2010): Repairing Double-Strand DNA Breaks. *Nature Education* 3(9):26

Nick McElhinny, S.A., Havener, J.M., Garcia-Diaz, M., Juarez, R., Bebenek, K., Kee, B.L., Blanco, L., Kunkel, T.A., Ramsden, D.A. (2005): A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol Cell* 19, 357-366.

Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Noordermeer, S.M., Canny, M.D., Brun, C.M., Strecker, J., Escribano-Diaz, C., Durocher, D. (2014): Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. *Science* 344, 189-193.

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

Pastwa, E., Blasiak, J. (2003): Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim Pol* 50, 891-908.

Patel, A.G., Sarkaria, J.N., and Kaufmann, S.H. (2011): Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3406-3411.

Rai, R., Zheng, H., He, H., Luo, Y., Multani, A., Carpenter, P.B., Chang, S. (2010): The function of classical and alternative non-homologous end-joining pathways in the fusion of dysfunctional telomeres. *EMBO J* 29, 2598-2610.

Robert, I., Dantzer, F., Reina-San-Martin, B. (2009): Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 206, 1047-1056.

Robert, I., Karicheva, O., Reina San Martin, B., Schreiber, V., Dantzer, F. (2013): Functional aspects of PARylation in induced and programmed DNA repair processes: preserving genome integrity and modulating physiological events. *Mol Aspects Med* 34, 1138-1152.

Roth, D.B., Porter, T.N., Wilson, J.H. (1985): Mechanisms of nonhomologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 5, 2599-2607.

Shaheen, M., Allen, C., Nickoloff, J.A., Hromas, R. (2011): Synthetic lethality: exploiting the addiction of cancer to DNA repair. *Blood* 117, 6074-6082.

Sharma, S., Raghavan, S.C. (2010): Nonhomologous DNA end joining in cell-free extracts. *J Nucleic Acids* 2010.

Simsek, D., Brunet, E., Wong, S.Y., Katyal, S., Gao, Y., McKinnon, P.J., Lou, J., Zhang, L., Li, J., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Holmes, M.C., Jasin, M. (2011): DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. *PLoS Genet* 7, e1002080.

Simsek, D., Jasin, M. (2010): Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. *Nat Struct Mol Biol* 17, 410-416.

- Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P., de Villartay, J.P. (2007): V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene* 26, 7780-7791.
- Sugawara, N., Ira, G., Haber, J.E. (2000): DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 20, 5300-5309.
- Sulli, G., Di Micco, R., d'Adda di Fagagna, F. (2012): Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 709-720.
- Symington, L.S. (2002): Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 630-670, table of contents.
- Truong, L.N., Li, Y., Shi, L.Z., Hwang, P.Y., He, J., Wang, H., Razavian, N., Berns, M.W., Wu, X. (2013): Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7720-7725.
- Venere, M., Hamerlik, P., Wu, Q., Rasmussen, R.D., Song, L.A., Vasanji, A., Tenley, N., Flavahan, W.A., Hjelmeland, A.B., Bartek, J., Rich, J.N. (2014): Therapeutic targeting of constitutive PARP activation compromises stem cell phenotype and survival of glioblastoma-initiating cells. *Cell Death Differ* 21, 258-269.
- Wang, M., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H., Iliakis, G. (2006): PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res* 34, 6170-6182.
- Weinfeld, M., Mani, R.S., Abdou, I., Aceytuno, R.D., Glover, J.N. (2011): Tidying up loose ends: the role of polynucleotide kinase/phosphatase in DNA strand break repair. *Trends Biochem Sci* 36, 262-271.
- Williams, R.S., Moncalian, G., Williams, J.S., Yamada, Y., Limbo, O., Shin, D.S., Grocock, L.M., Cahill, D., Hitomi, C., Guenther, G., Moiani, D., Carney, J.P., Russell, P., Tainer, J.A. (2008). Mre11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease processing in double-strand-break repair. *Cell* 135, 97-109.
- Wu, P.Y., Frit, P., Meesala, S., Dauvillier, S., Modesti, M., Andres, S.N., Huang, Y., Sekiguchi, J., Calsou, P., Salles, B., Junop, M.S. (2009): Structural and functional interaction between the human DNA repair proteins DNA ligase IV and XRCC4. *Mol Cell Biol* 29, 3163-3172.
- Wyatt, H.D., Sarbajna, S., Matos, J., West, S.C. (2013): Coordinated Actions of SLX1-SLX4 and MUS81-EME1 for Holliday Junction Resolution in Human Cells. *Mol Cell* 52, 234-247.

Xie, A., Kwok, A., Scully, R. (2009): Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nat Struct Mol Biol* 16, 814-818.

Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., Rajewsky, K., Alt, F.W. (2007): IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* 449, 478-482.

Zhang, Y., Jasin, M. (2011): An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway. *Nat Struct Mol Biol* 18, 80-84.

## 9 Seznam použitých zkratk a symbolů

ADP – Adenosindifosfát

aNHEJ – Alternative non-homologous end joining – alternativní spojování nehomologických konců

ATM – Ataxia telangiectasia mutated

ATR – ATR ataxia telangiectasia and Rad3 related

BLM – The Bloom's syndrome helicase

BCR-ABL – Onkogenní fúzní protein způsobující chronickou myeloidní leukémií

BRCT – BRCA1 C terminal

CDK – Cyklin dependentní kináza

CHK1/2 – Checkpoint kinase 1/2 – kinázy 1/2 kontrolního bodu

CML – Chronická myeloidní leukémie

CSR – Class switch rekombinace

CtIP – C-terminal-binding protein interacting protein

DDR – DNA damage response – odpověď na poškozenou DNA

dHJ – Double Holliday junction – dvojitá Hollidayova struktura

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimethylsulfoxid

DNA-PKcs – DNA dependentní protein kináza

DSBs – Double strand break(s) – dvouvláknové zlomy

DSBR – Oprava dvouvláknového zlomu

EDTA – Ethylendiamintetraoctová kyselina

FBS – bovinní fetální sérum

GFP – Green fluorescent protein – červený fluorescenční protein

HJ – Holliday junction – Hollidayův spoj

hnRNP K – Heterogenní jaderný ribonukleoprotein K

HR – Homologní rekombinace

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

MRN – MRE11 - RAD50 - NBS1

MRX – Mre11 - Rad50 - Xrs2

NAD<sup>+</sup> – Nikotinamid adenin dinukleotid (redukovaná forma)

NHEJ – Non-homologous end joining – spojování nehomologických konců  
nt – nukleotidy  
PAR – Poly(ADP-ribóza)polymer  
PARP1/2/3 – Poly(ADP-ribóza)polymeráza 1/2/3  
PARPs – Poly(ADP-ribóza)polymerázy  
PBS – Phosphate buffered saline – fosfátový isotonický roztok  
PNK – Polynukleotidová kináza  
POT1 – Protection of telomeres 1  
RAG1/2 – Recombination activating gene 1/2  
RFP – Red fluorescent protein – červený fluorescenční protein  
RIF1 – Rap1 interacting factor 1  
RPA – Replikační protein A  
RSS – rekombinační signální sekvence  
SCID – Severe combined immunodeficiency syndrome  
SDSA – Synthesis dependent strand annealing – na syntéze závislý strand annealing  
SEI – Single – end invasion  
SSA – Single strand annealing  
SSBs – Single strand break(s) – jednovláknové zlomy  
ssDNA – Single stranded DNA – jednovláknová DNA  
TPP1 – Tripeptidyl peptidáza I  
TRF1/2 – Telomeric repeat binding factor 1/2  
V(D)J – Variable, diversity, joining  
XLF – XRCC4-like factor  
XRCC1/4 – X-ray repair cross-complementing protein 1/4  
53BP1 – p53 binding protein 1 – p53 vázající protein 1