

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2021

Bc. Zuzana Macháčová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Role proteinového komplexu
P97/NPL4 při opravě poškozené
DNA**

Diplomová práce

Bc. Zuzana Machačová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: Mgr. Zdeněk Škrott, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Zuzana MACHAČOVÁ
Osobní číslo: R190064
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Role proteinového komplexu p97/NPL4 při opravě poškozené DNA
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Vypracování literární rešerše na dané téma, určování viability buněk (XTT test, koloniformní test) a analýza markerů poškození DNA (western blot, imunofluorescenční analýza, kvantitativní mikroskopie, mikroskopie na živých buňkách)

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

- Meyer H, Bug M, Bremer S. (2012). Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nature Cell Biology*, 14(2), 117-23.
- Meerang M, Ritz D, Paliwal S, Garajova Z, Bosshard M, Mailand N, Janscak P, Hübscher U, Meyer H, Ramadan K. (2011). The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks. *Nature Cell Biology*, 13(11), 1376-82.
- Ramadan K. (2012). p97/VCP- and Lys48-linked polyubiquitination form a new signaling pathway in DNA damage response. *Cell Cycle*, 11(6), 1062-9.
- Jackson SP et Bartek J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071-8.
- Škrott Z, Mistrik M, Andersen KK, Friis S, Majera D, Gursky J, Ozdian T, Bartkova J, Turi Z, Moudry P, Kraus M, Michalova M, Vaclavkova J, Dzubak P, Vrobel I, Pouckova P, Sedlacek J, Miklovicova A, Kutt A, Li J, Mattova J, Driessen C, Dou QP, Olsen J, Hajduch M, Cvek B, Deshaies RJ, Bartek J. (2017). Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4. *Nature*, 552(7684), 194-199.
- Acs K, Luijsterburg MS, Ackermann L, Salomons FA, Hoppe T, Dantuma NP. (2011). The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(12), 1345-50.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Zdeněk Škrott
Ústav molekulární a translační medicíny



Datum zadání diplomové práce: 12. října 2019
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2021

LS.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

UNIVERZITA PALACKÉHO
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ FYZIKY
Slechtitelů ET
tel. +420 585 624 111



01-11-2019

Bibliografické údaje:

Jméno a příjmení autora	Bc. Zuzana Macháčová
Název práce	Role proteinového komplexu P97/NPL4 při opravě poškozené DNA
Typ práce (bakalářská, diplomová)	Diplomová práce
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Zdeněk Škrott, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Diplomová práce se věnuje roli proteinového komplexu P97/NPL4 a jeho zapojení do opravy poškozené DNA. Literární přehled je zaměřen na ubikvitin-proteazomový systém a jeho nezbytnou složku, segregázu P97/VCP. P97 je důležitý regulátor proteostázy, ale v posledních letech se výzkum zaměřuje také na jeho roli při opravě DNA. Jeho kofaktory NPL4-UFD1 obsahují motiv rozpoznávající ubikvitin, čímž umožňují segregáze vázat polyubikvitinované substráty. Těmi mohou být také polyubikvitinované proteiny navázané na poškozenou DNA. Experimentální část práce je zaměřena na metodu laserové mikroiradiace, pomocí níž byly v buněčných liniích stabilně exprimujících GFP-značené proteiny indukovány léze v DNA a poté byla v čase pozorována vazba těchto proteinů do míst poškození. Následně byl studován vliv různých inhibitorů ubikvitin-proteazomového systému Bortezomibu, CB-5083, MLN7243 a CuET na shlukování těchto proteinů v místech lézí. Zároveň byla testována kombinace inhibitoru P97 CB-5083 s ionizujícím zářením a látkami indukujícími poškození DNA jako je cisplatina, doxorubicin a inhibitor ATR kinázy AZD6738.

Klíčová slova	Proteazom, ubikvitin, ubikvitin-proteazomový systém, P97, VCP, NPL4, UFD1, poškození DNA, oprava DNA, laserová mikroiradiace, CB-5083, Bortezomib, MLN7243, CuET, CFA, cisplatina, doxorubicin, AZD6738
Počet stran	90
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Bc. Zuzana Macháčová
Title	The role of P97/NPL4 protein complex in the repair of damaged DNA
Type of thesis (bachelor, master)	Master thesis
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Supervisor	Mgr. Zdeněk Škrott Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	<p>This diploma thesis deals with the topic of the protein complex P97/NPL4 and its involvement in the repair of the damaged DNA. The literary review is focused on the ubiquitin-proteasome system and its essential component, segregase P97/VCP. P97 is an important regulator of proteostasis, however, the research also focuses on its involvement in the repair of the damaged DNA. Its cofactors NPL4-UFD1 contain a ubiquitin-recognizing motif, which allows segregase to bind itself on the polyubiquitinated substrates. These substrates may represent the polyubiquitinated proteins bonded on the damaged DNA. The experimental part of the thesis is focused on the method of laser microirradiation, which allows precise induction of DNA lesions. Cell lines expressing various GFP-tagged proteins were microirradiated and followed in time by confocal microscopy to monitor the recruitment of GFP- reporters. Moreover, various inhibitors of the ubiquitin-proteasome system like Bortezomib, CB-5083, MLN7243 and CuET were used to investigate the determinants of the accumulation of these proteins in the sites of damage. The combinations of the inhibitor P97 CB-5083 with ionizing radiation and DNA damage-inducing agents like cisplatin, doxorubicin and AZD6738, an inhibitor of ATR kinase, were also tested.</p>
Keywords	Proteasome, ubiquitin, ubiquitin-proteasome system, P97, VCP, NPL4, UFD1, DNA damage, DNA repair, laser microirradiation, CB-5083, Bortezomib, MLN7243, CuET, CFA, cisplatin, doxorubicin, AZD6738
Number of pages	90
Number of appendices	0
Language	czech

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Zdeňka Škrotta, Ph.D. a za použití literárních zdrojů uvedených v závěru práce.

V Olomouci dne

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Zdeňku Škrottovi, Ph.D., za jeho ochotu, odborné vedení, cenné rady a čas, který mi věnoval. Zároveň bych ráda poděkovala celému pracovišti Laboratoře integrity genomu z Ústavu molekulární a translační medicíny za vlídný přístup a poskytnutí laboratoří pro experimentální část této práce. Mé poděkování patří v neposlední řadě také rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia a při psaní této práce podporovali. Tato diplomová práce byla podpořena grantem Univerzity Palackého v Olomouci (IGA_LF_2021_030).

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Ubikvitin-proteazomový systém (UPS)	3
3.1.1	Ubikvitin a ubikvitinace	4
3.1.2	Proteazom.....	7
3.1.3	Další důležité složky UPS.....	9
3.2	UPS jako terapeutický cíl při léčbě rakoviny.....	12
3.2.1	Role proteazomu během rakoviny.....	12
3.2.2	Terapeutické přístupy v léčbě rakoviny využívající inhibici UPS	12
3.2.3	Role P97 v rakovinných buňkách.....	16
3.2.4	Alternativní přístupy v léčbě rakoviny využívající inhibici P97 a jeho kofaktorů.....	18
3.3	Obranné mechanismy buňky na poškození DNA a role UPS během těchto procesů ..	21
3.3.1	ATM-Chk2 a ATR-Chk1	24
3.3.2	Role UPS při DDR.....	24
3.3.3	Léčba rakoviny látkami indukujícími poškození DNA a jejich kombinace s proteazomovými inhibitory	27
3.3.4	Další experimentální přístupy v léčbě rakoviny.....	31
4	Materiál a metody	33
4.1	Biologický materiál.....	33
4.2	Použité soupravy a chemikálie.....	33
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	35
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	35
4.4.1	Kultivace buněk	35
4.4.2	Transfekce buněčné linie.....	36
4.4.3	Příprava buněčných lysátů	36
4.4.4	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v denaturačních podmínkách (SDS-PAGE).....	36
4.4.5	Western blotting	36
4.4.6	Laserová mikroiradiace.....	37

4.4.7	Imunofluorescence	38
4.4.8	Koloniformní assay (CFA; Colony Formation Assay).....	38
5	Výsledky	40
5.1	Konstrukce buněčných linií stabilně exprimujících GFP-značené proteiny	40
5.2	Efekt spolupůsobení UV-A, 8-methoxypsoralenu a různých inhibitorů složek UPS na dynamiku proteinů zapojených do DDR	41
5.2.1	P97-GFP kolokalizuje se signálem γ H2AX po fotoaktivaci 8-methoxypsoralenu.....	41
5.2.2	Prostorová a časová dynamika P97-GFP při rekrutování do míst laserového poškození	42
5.2.3	P97-GFP se rekrutuje do míst poškození i při presenzitizaci buněk BrdU a Heochstem33258.....	44
5.2.4	Různé inhibitory složek UPS zamezují rekrutování P97-GFP v místě poškození DNA.....	45
5.2.5	NPL4 se rekrutuje do míst poškození DNA.....	47
5.2.6	Vliv mutací NPL4 na schopnost vázat ubikvitin.....	47
5.2.7	Vliv různých inhibitorů složek UPS na rekrutování NPL4-GFP	49
5.2.8	Laserem indukované poškození DNA způsobuje akumulaci ubikvitinu v místě DBS.....	51
5.2.9	Vliv inhibitorů různých složek UPS na rekrutování Ub-GFP do míst poškození DNA.....	52
5.2.10	Kombinace laserové mikroiradiace a CB-5083 je silně toxická	53
5.3	Efekt spolupůsobení inhibitoru CB-5083 s IR zářením a běžnými chemoterapeutiky	55
5.3.1	CB-5083 s IR záření se vzájemně potencují	55
5.3.2	CB-5083 vykazuje v kombinaci s běžně využívanými chemoterapeutiky cisplatinou a doxorubicinem synergický účinek	57
5.3.3	Inhibitor segregázy P97 CB-5083 nepotencuje účinek inhibitoru ATR AZD6738.....	62
6	Diskuze.....	65
7	Závěr	70
8	Literatura.....	72

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

53BP1	Tumor supresor P53-Binding Protein 1
AAA proteiny	ATPases Associated with diverse cellular Activities; ATPázy asociované s různými buněčnými aktivitami
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosintrifosfát
ATR	Ataxia Telangiectasia and RAD3-Related
ATX3	Ataxin 3
BER	Base-Excision Repair; bázová excizní oprava
BRCA1	BReast CAncer type 1 susceptibility protein
BRCA2	BReast CAncer type 2 susceptibility protein
CAD	Chromatin-Associated Degradation; degradace spojená s chromatinem
CFA	Colony Formation Assay; test tvorby kolonií
CI	Combination Index; kombinační index
CP	Core Particle; Centrální katalytická část proteazomu
CuET	Komplex DTC-měď
DSB	Double Strand Break; dvouvláknový zlom DNA
DDR	DNA Damage Repair; oprava poškozené DNA
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNA-PK	DNA-Protein Kinase; DNA-protein kináza
DSBR	Double Strand Break Repair; oprava dvouvláknového zlomu
DSF	Disulfiram
DTC	Diethyldithiokarbamát / Ditiokarb
DUB	Deubikvitinační enzym
E1	Ubikvitin aktivující enzym

E2	Ubikvitin konjugální enzym
E3	Ubikvitin ligační enzym / Ubikvitin ligáza
ER	Endoplazmatické retikulum
ERAD	Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation; Degradace spojená s endoplazmatickým retikulem
FDA	Food and Drug Administration; Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
HECT E3	Homologous to E6AP C-Terminus; typ E3
HR	Homologous Recombination; Homologní rekombinace
HSR	Heat-Shock Response; reakce na tepelný šok
Chk1	Checkpoint Kinase 1
Chk2	Checkpoint Kinase 2
IR	Ionizing Radiation; ionizující záření
I κ B- α	Inhibitor NF- κ B
L3MBTL1	Lethal (3) Malignant Brain Tumor-Like protein 1
MAD	Mitochondria-Associated Degradation; Degradace spojená s mitochondriemi
MCL	Mantle-Cell Lymphoma; Lymfom pláštěvých buněk
MDC1	Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1
MGMT	Methylguanin DNA MethylTransferase; Methylguanin DNA methyltransferáza
MM	Multiple Myeloma; Mnohočetný myelom
MMR	Mismatch Mediated Repair; Oprava chybného párování bází
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrome 1 protein
NER	Nucleotide-Excision Repair; Nukleotidová excizní oprava
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B; Nukleární Faktor Kappa B
NHEJ	Non-Homologous End Joining; Oprava spojením nehomologních konců

	DNA
NOS	Reaktivní dusíkové radikály
NPL4	Nuclear Protein Localization protein 4
NZF	NPL4-Zinc Finger; Zinková doména NPL4 zodpovědná za rozpoznání ubikvitinu
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PI	Proteazomové inhibitory
RAD	Ribosome-Associated Degradation; Degradace spojená s ribozomy
RAP80	Receptor-Associated Protein 80
RING E3	Really Interesting New Gene; typ E3
RNF168	Ring Finger Protein 8
RNF8	Ring Finger Protein 168
ROS	Reaktivní kyslíkové radikály
RP	Regulatory Particle(s); Regulační část(i) proteazomu
RPN jednotka	Regulatory Particle of Non-ATPase subunits; Jednotka regulační částice proteazomu bez ATPázové aktivity
RPT jednotka	Regulatory Particle of Triple-ATPase subunits; Jednotka regulační částice proteazomu s ATPázovou aktivitou
RS	Replication Stress; Replikační stres
SSB	Single Strand Break; Jednovláknový zlom DNA
UAE	Ubikvitin aktivační enzym
Ub	Ubikvitin
UBA	Ubiquitin-Associated Domain; Doména spojená s ubikvitinem
Ub-AMP	Ubikvitin s navázaným adenosinmonofosfátem
UBD	Ubiquitin-Binding Domain; Ubikvitin vazebná doména
UFD1	Ubiquitin Recognition Factor In ER Associated Degradation 1

UN	UFD1-NPL4 complex; komplex UFD1-NPL4
UPR	Unfolded Protein Response
UPS	Ubiquitin-Proteasome System; Ubikvitin-proteazomový systém
VCP	Valosin-Containing Protein; Protein obsahující valosin, další název pro P97
XPA	Xenoderma Pigmentosum protein A
ZF-NPL4	Zinc Finger-NPL4; Zinková doména NPL4
γ H2AX	Fosforylovaný histon H2AX

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Schématický proces ubikvitinace substrátu	5
Obr. 2: Detailní proces ubikvitinace.	6
Obr. 3: Struktura proteazomu.....	8
Obr. 4: Proteolytická místa v proteazomu 20S.	9
Obr. 5: Architektura proteinu P97.....	10
Obr. 6: Model pro aktivitu P97.....	11
Obr. 7: Znázornění inhibice aktivního místa $\beta 5$ Bortezomibem.....	13
Obr. 8: Chemická struktura Bortezomibu.	14
Obr. 9: Mechanismy účinku Bortezomibu, kterými je indukována smrt v myelomových buňkách..	15
Obr. 10: Chemická struktura Carfilzomibu.....	16
Obr. 11: Schématické znázornění rozmanitých funkcí P97.....	18
Obr. 12: Typy poškození DNA a jejich opravné mechanismy..	22
Obr. 13: Počáteční signalizace v místě poškození DNA.....	25
Obr. 14: Rekrutování 53BP1 a BRCA do míst poškození DNA.	27
Obr. 15: Chemická struktura cisplatiny a doxorubicinu. (A) Cisplatina. (B). Doxorubicin.	29
Obr. 16: Typy poškození generované vybranými chemoterapeutiky a IR zářením.....	30
Obr. 17: Princip laserové mikroiradiace.	38
Obr. 18: Průkaz úspěšné transfekce buněčných linií H1299 a U-2 OS vektorem pCMV6-VCP-GFP.	40
Obr. 19: P97-GFP kolokalizuje se signálem γ H2AX po fotoaktivaci 8-methoxypsoralenu.....	42
Obr. 20: Časová a prostorová dynamika P97-GFP v reakci na indukované poškození DNA pozorovaná na buněčné linii U-2 OS.	43
Obr. 21: Časová a prostorová dynamika P97-GFP v reakci na indukované poškození DNA pozorovaná na buněčné linii H1299.....	43
Obr. 22: Vliv presenzitizačních činidel Hoechst33258 a BrdU na rekrutování P97-GFP.....	44
Obr. 23: Vliv CB-5083 na rekrutování P97-GFP v místě poškození na příkladu buněčné linie H1299.....	45
Obr. 24: Vliv různých inhibitorů UPS na rekrutování P97-GFP v místě poškození na příkladu buněčné linie U-2 OS.....	46
Obr. 25: Časová a prostorová dynamika NPL4-GFP v reakci na indukované poškození DNA pozorovaná na buněčné linii U-2 OS.....	47
Obr. 26: Sekvence aminokyselin NPL4 proteinu v mutantních buněčných liniích.	48
Obrázek 27: Vliv mutací NPL4 na vazbu ubikvitinu.....	49
Obr. 28: Vliv různých inhibitorů UPS na rekrutování NPL4-GFP v místě poškození na příkladu buněčné linie U-2 OS.....	51

Obr. 29: Časová a prostorová dynamika Ub-GFP v reakci na indukované poškození DNA pozorovaná na buněčné linii U-2 OS.	52
Obr. 30: Vliv různých inhibitorů UPS na rekrutování Ub-GFP v místě poškození na příkladu buněčné linie U-2 OS.	53
Obr. 31: Vliv samotné laserové mikroiradiace na rakovinné buňky U-2 OS se stabilní expresí Ub-GFP.	54
Obr. 32: Vliv laserové mikroiradiace na rakovinné buňky U-2 OS se stabilní expresí Ub-GFP v kombinaci s inhibitorem CB-5083.	54
Obr. 33: Křivky přežití buněčných linií U-2 OS a H1299 po působení CB-5083 v různých koncentracích.	55
Obr. 34: Účinek ionizujícího záření v kombinaci s CB-5083 na příkladu buněčné linie U-2 OS.	56
Obr. 35: Účinek ionizujícího záření v kombinaci s CB-5083 na příkladu buněčné linie H1299.	57
Obr. 36: Křivky přežití buněčných linií U-2 OS a H1299 po působení různých koncentrací cisplatin.	58
Obr. 37: Účinek cisplatin v kombinaci s CB-5083 na příkladu buněčné linie U-2 OS.	58
Obr. 38: Účinek cisplatin v kombinaci s CB-5083 na příkladu buněčné linie H1299.	59
Obr. 39: Hodnocení synergického efektu cisplatin na působení CB-5083 v buněčných liniích U-2 OS a H1299.	60
Obr. 40: Křivka přežití buněčné linie U-2 OS po působení různých koncentrací doxorubicinu.	61
Obr. 41: Účinek doxorubicinu v kombinaci s CB-5083 na příkladu buněčné linie U-2 OS.	61
Obr. 42: Hodnocení synergického efektu doxorubicinu na působení CB-5083.	62
Obr. 43: Křivky přežití buněčné linie U-2 OS po působení různých koncentrací doxorubicinu.	63
Obr. 44: AZD6738 v kombinaci s CB-5083 na příkladu buněčné linie U-2 OS nevykazuje aditivní účinek.	63
Obr. 45: AZD6738 v kombinaci s CB-5083 na příkladu buněčné linie H1299 nevykazuje aditivní účinek.	64

1 ÚVOD

Eukaryotická homeostáza proteinů, tzv. proteostáza, je pro buněčný vývoj zcela zásadní a její integrita je neustále sledována. Rakovinné buňky jsou v důsledku genomických abnormalit vystaveny silné akumulaci chybně složených buněčných proteinů. Aby si rakovinné buňky zachovaly proteostázi, mají zvýšené mechanismy degradace proteinů, na nichž jsou silně závislé. Vývoj léčiv, které narušují odbourávání bílkovin a indukují tak proteotoxický stres, má značný potenciál pro protirakovinnou terapii. Nejvýznamnějším mechanismem kontroly kvality proteinů je ubikvitin-proteazomový systém. Ubikvitin je malý protein, který se váže na lysinové zbytky proteinových substrátů prostřednictvím třístupňové enzymatické kaskády zvané ubikvitinace. Generované polyubikvitinační signály jsou rozpoznávány regulačními částicemi proteazomu. Řetězce polyubikvitinu jsou z těchto proteinů regulačními částicemi odstraněny a zachycen je jen samotný substrátový protein, který je následně rozvolněn a translokován do centrální katalytické části proteazomu k proteolýze. Důležitost cílení ubikvitin-proteazomového systému byla v klinickém prostředí prokázána úspěchem inhibitorů proteazomu při léčbě hematologických malignit. Nedostatečná aktivita těchto inhibitorů u ostatních typů nádorů a vznikající rezistence však podporuje potřebu vyvíjet inhibitory dalších regulátorů homeostázy bílkovin.

Dalším nezbytným proteinem zachovávajícím buněčnou proteostázu je protein P97. Tento molekulární chaperon se prostřednictvím kofaktorů NPL4-UFD1 rozpoznávajících polyubikvitinační signál váže na proteinové substráty, extrahuje je a transportuje k recyklaci nebo proteazomální degradaci. Široké zapojení proteinu P97 do regulace proteostázy naznačuje, že je jeho inhibice slibnou cestou v léčbě rakoviny, která má potenciál překonat i nedostatky proteazomových inhibitorů. V posledních letech se výzkum zaměřuje také na roli P97 při opravě poškozené DNA. Skrze své kofaktory je tato segregáza schopna rozpoznávat polyubikvitinační signál histonů poškozené DNA. Potenciál v cílení tohoto proteinu v rámci protinádorové terapie tak roli P97 a jeho kofaktorů při opravě poškozené DNA ještě více zdůrazňuje.

2 CÍLE PRÁCE

Diplomová práce se snaží pojmout základní teoretické znalosti o roli proteinového komplexu P97/NPL4 při opravě poškozené DNA. Shrnuje však i jeho důležitost v zapojení do ubikvitin-proteazomové degradace. Dále shrnuje dosavadní poznatky o cílení tohoto komplexu vyvíjenými inhibitory v rámci protirakovinné terapie.

V experimentální části práce je studována dynamika GFP-značených proteinů ubikvitinu, P97 a NPL4 pro objasnění jejich zapojení do opravy poškozené DNA. Práce se zabývá také vlivem inhibitorů různých složek ubikvitin-proteazomového systému na rekrutování těchto GFP-značených proteinů do míst poškození DNA. Zaměřuje se také na vliv inhibitoru P97 CB-5083 na viabilitu buněk, a to jak samostatně, tak v kombinaci s běžně používanými chemoterapeutiky.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Ubikvitin-proteazomový systém (UPS)

Eukaryotické buňky se během svého života musí potýkat s nepřetržitým proudem chybně složených proteinů, k jejichž vzniku často dochází v důsledku stochastických fluktuací, přítomnosti destabilizujících mutací, stresových stavů nebo jedinečných metabolických problémů a stárnutí buňky (Chen *et al.*, 2011a). Tyto abnormálně složené nebo poškozené proteiny jsou pro buňku potenciálně nebezpečné, jelikož ztrácejí svou přirozenou funkci a mají tendenci se v buňce agregovat, čímž narušují rovnováhu homeostázy buněčných proteinů a ohrožují životaschopnost buněk (Lecker *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2009; Amm *et al.*, 2014). Eukaryotická proteinová homeostáza, tzv. proteostáza, je pro vývoj buněk zásadní. Koriguje buněčné stárnutí, chrání buňky před poškozením, onemocněním, a jakékoliv její nedostatky vedou k metabolickým, onkogenním, neurodegenerativním a kardiovaskulárním poruchám (Bedford *et al.*, 2010). Integritu proteomu neustále sleduje a udržuje propracovaná síť molekulárních chaperonů a faktorů degradace proteinů. Kontrola kvality buněčných proteinů se opírá o tři odlišné, ale vzájemně propojené strategie, přičemž chybně složené proteiny mohou být buď znovu složeny, degradovány nebo doručeny do odlišných oddělení pro kontrolu kvality, které oddělují potenciálně škodlivé špatně složené druhy. Rozhodující roli při určování osudu chybně složených proteinů v buňce hrají právě molekulární chaperony (Chen *et al.*, 2011).

Nejvýznamnějšími mechanismy kontroly kvality proteinů jsou ubikvitin-proteazomový systém a autofagický vakuolární (lysozomální) systém (Huang *et al.*, 2009; Amm *et al.*, 2014). Autofagie je nespecifická degradační dráha, která je rozhodující při rozkladu proteinů dostávajících se do buněk endocytózou, a při rozkladu cytoplazmatických proteinů a poškozených organel (Chen *et al.*, 2011). Ubikvitin-proteazomový systém (UPS) zprostředkovává degradaci cytosolických proteinů eukaryot (Nandi *et al.*, 2006) a zahrnuje síť enzymů, která je zodpovědná za udržování homeostázy buněčných proteinů (Hershko *et al.*, 1998; Hyer *et al.*, 2018).

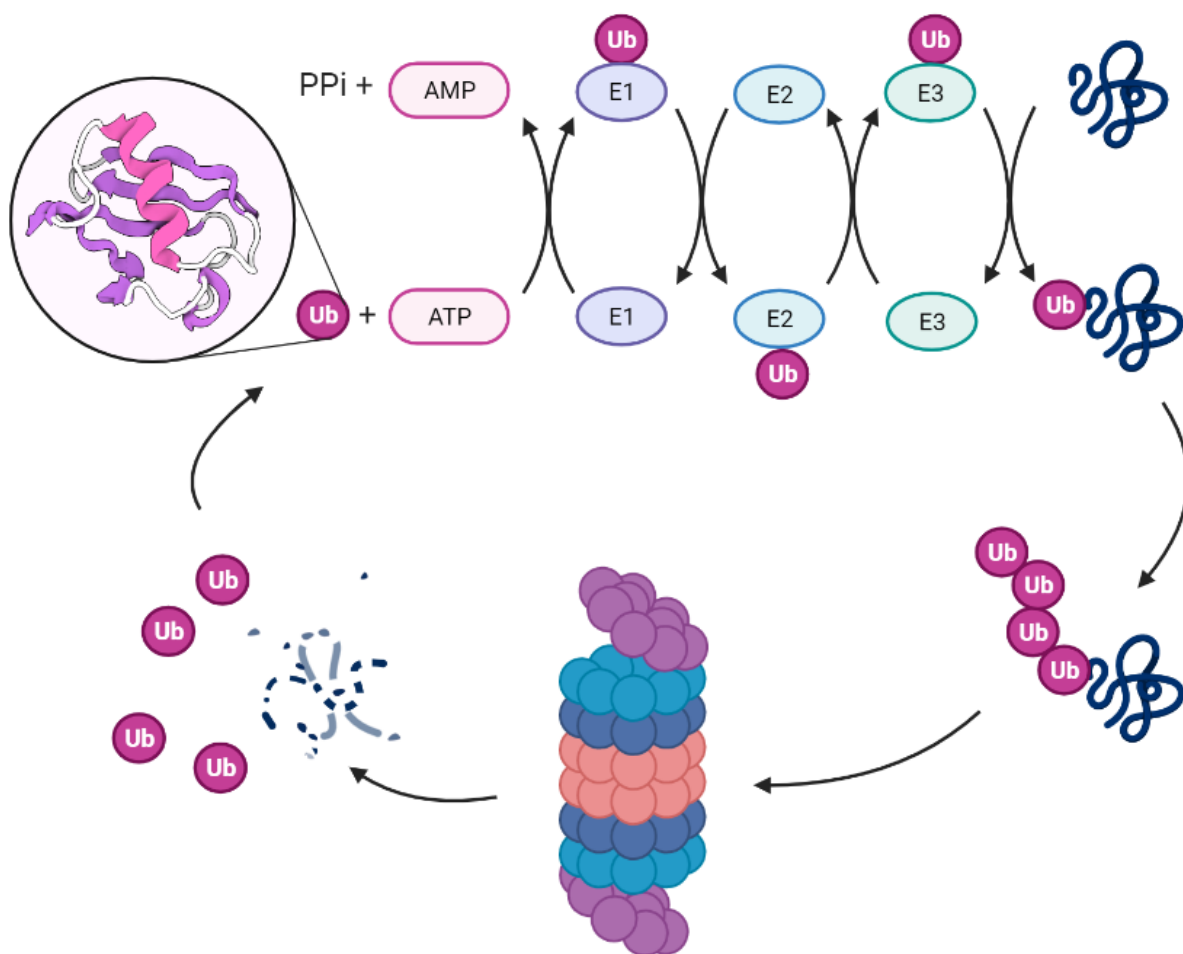
Před objevením UPS bylo známo, že k určité degradaci intracelulárních proteinů prostřednictvím lysozomální degradace (autofagie) dochází. Tento mechanismus však nevysvětloval všechny aspekty regulace a kontroly intracelulárních proteinů, zejména jejich rozdílnou rychlost degradace (Esseltine *et al.*, 2012). Protože na počátku 70. let nebylo prakticky nic známo o cestách proteinového katabolismu v buňkách, rozhodlo se mnoho vědců zaměřit svůj výzkum právě na biochemické mechanismy degradace proteinů (Goldberg, 2012). S prvním úspěchem přišel A. L. Goldberg, který se svým výzkumným týmem prokázal existenci nové nelysozomální proteolytické dráhy závislé na ATP, selektivně eliminující špatně složené proteiny (Goldberg *et al.*, 1974; Goldberg *et al.*, 1976). Nezávisle na jejich pozorování objevil J. H. Harris v buňkách cylindrický proteinový komplex o délce 170A a sedimentačním koeficientem 22,5S (Harris, 1971). Důležitým se stal také objev ubikvitinu, který prvně

identifikoval roku 1975 G. Goldstein, a který posloužil jako značka pro identifikaci substrátových proteinů určených k proteolytické destrukci, a následně také samotné proteázy (Esseltine *et Mulligan*, 2012; Kumari *et al.*, 2018). Zásadní pokrok přišel na začátku 80. let s objevem ATP-dependentní degradace intracelulárních proteinů, jejíž specifita je určena interakcí s proteiny značenými polyubikvitinovým řetězcem (Bešše *et al.*, 2014). Za tímto objevem stojí A. Ciechanover, A. Hershko a I. Rose, kteří za identifikaci ubikvitin-proteazomového systému získali roku 2004 Nobelovu cenu za chemii (Esseltine *et Mulligan*, 2012). V roce 1987 Goldberg a další výzkumné skupiny popsali velmi velký proteazomový komplex závislý na ATP degradující proteiny konjugované s ubikvitinem, který následně nazvali 26S proteazom (Goldberg, 2012). Cestou ATP-dependentní degradace prostřednictvím proteazomu je degradováno více než 80 % buněčných proteinů, včetně těch, které se podílejí na regulaci důležitých buněčných a fyziologických funkcí, jako je buněčný cyklus a apoptóza, transkripce nebo oprava DNA (Bešše *et al.*, 2014). Během procesu degradace prostřednictvím UPS jsou buněčné proteiny určené k degradaci značeny multimery evolučně konzervovaného proteinu ubikvitinu, a následně jsou degradovány velkou cytosolickou proteázou, 26S proteazomem (Nandi *et al.*, 2006).

3.1.1 Ubikvitin a ubikvitinace

Ubikvitin (Ub) je protein složený ze 76 aminokyselin a jako takový nese mnoho potenciálních míst pro další posttranslační modifikace, čímž se vytváří velké množství odlišných signálů s odlišnými buněčnými výstupy, označovaných jako „ubikvitinový kód“. Proto je samotná ubikvitinace (připojení ubikvitinu k proteinu) dynamickou posttranslační modifikací. Ubikvitin je připojen k substrátům sofistikovanou třístupňovou enzymatickou kaskádou (**Obr. 1 a 2**) využívající ubikvitin aktivující (E1), ubikvitin konjugující (E2) a řadu ubikvitin ligujících (E3) enzymů (Komander *et Rape*, 2012; Swatek *et Komander*, 2016). Tyto enzymy kovalentně připojují ubikvitin na lysinový zbytek substrátu nebo na předchozí molekulu ubikvitinu v řetězci za vzniku polypeptidu ubikvitinu (Borissenko *et Groll*, 2007). Ubikvitinový polypeptid obsahuje 7 lysinových zbytků (K6, K11, K27, K29, K33, K48 a K63) a každý z nich může sloužit jako vazebné místo pro spojení s další molekulou ubikvitinu. V závislosti na zbytku lysinu, který se podílí na tvorbě polyubikvitinového řetězce, existuje několik typů ubikvitinových řetězců mající různé fyziologické funkce. Polyubikvitinované řetězce vázající lysin v pozici 48 (K48-polyubikvitinované řetězce) jsou známé pro svou roli v cílení proteinů na proteazomální degradaci, zatímco řetězce vázající lysin v pozici 63 (K63-polyubikvitinované řetězce) jsou zapojeny do oprav DNA, replikace DNA a přenosu signálu. Buněčné funkce K11-polyubikvitinovaných řetězců jsou méně dobře známy, avšak některé studie odhalily jejich zapojení při kontrole buněčného cyklu (Shen *et al.*, 2013).

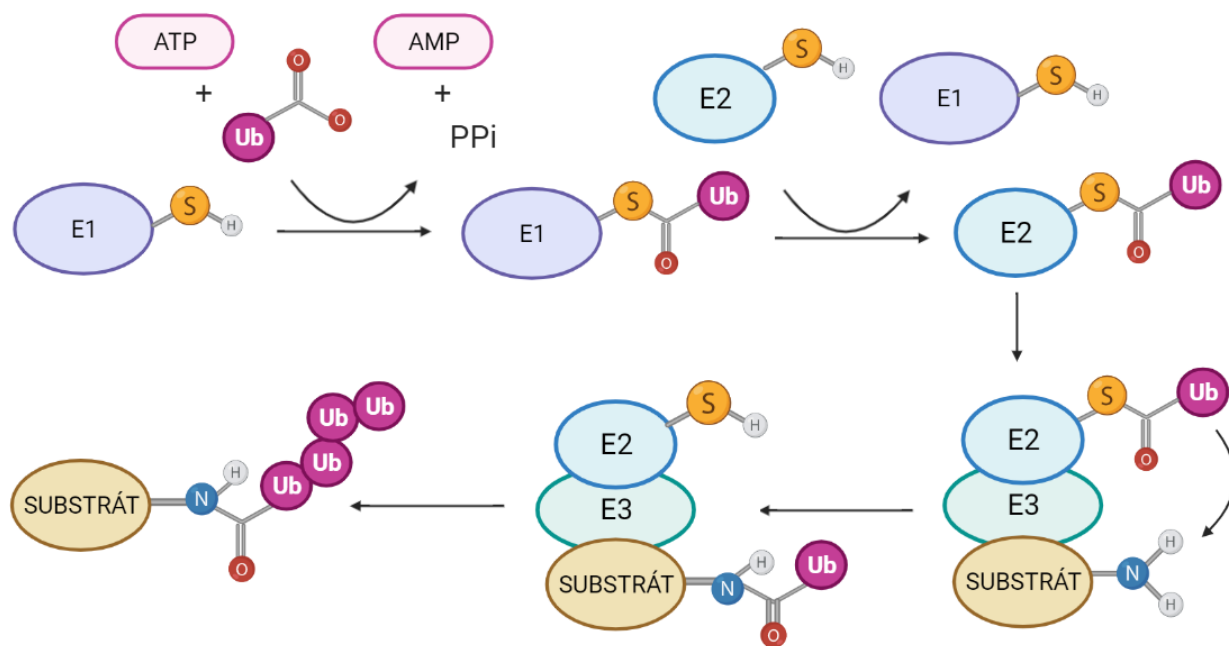
Tvorba řetězce ubikvitinu může být rozdělena do dvou klíčových kroků: zaprvé iniciace konjugace prvního ubikvitinu k substrátu; a za druhé prodloužení řetězce (Heride *et al.*, 2014). Konjugace ubikvitinu je u savců iniciována dvěma klíčovými enzymy, ubikvitin aktivujícími enzymy UAE (také známými jako UBA1) a UBA6, které jsou společně označovány jako enzymy E1. UAE katalyzuje všechny buněčné ubikvitin-konjugací enzymy E2, s výjimkou E2 USE1, jež je katalyzován UBA6. Enzymy E2 spolupracují s buněčnými E3 ligázami, které dále směřují ubikvitinaci k cílovému proteinu (Hyer *et al.*, 2018). Polymerní ubikvitinace vedou k degradaci nebo recyklaci daného proteinu proteazomem 26S (Pye *et al.*, 2007).



Obr. 1: Schématický proces ubikvitinace substrátu. Molekula ubikvitinu (Ub) je prostřednictvím třístupňové enzymatické kaskády zajišťované ubikvitinujícími enzymy (E1-E3) připojena k molekule substrátu. Substrát s polyubikvitinovanými řetězci podléhá degradaci v proteazomu. Molekula Ub může být zpětně využita v další kaskádové reakci. Vytvořeno v BioRender.com dle Nabavi *et al.*, 2018.

Enzymy aktivující ubikvitin (E1) využívají ATP k vytvoření thioesterové vazby mezi karboxylovým koncem ubikvitinu (Ub) a sulfoskupinou cysteinu aktivního místa E1. Klíčovým

rysem téhle reakce je tvorba meziprojektu Ub-AMP, který reaguje s cysteinem. Následně je vytvořen druhý Ub-AMP, který zůstává nekovalentně vázán na enzym a zvyšuje tím jeho účinnost. Takové strukturální přestavby zvyšují afinitu ubikvitinu k ubikvitin konjugačním enzymům (E2). Tímto je usnadněn přenos ubikvitinu na sulfoskupinu cysteinu v aktivním místě E2 prostřednictvím trans-thioesterifikační reakce, během které se vytváří nová vysokoenergetická thioesterová vazba. Ubikvitin ligázy (E3) katalyzují kovalentní připojení ubikvitinu k cílovému substrátu pomocí isopeptidové vazby (Gong *et al.*, 2016). Lidský genom kóduje více než 600 E3 (Weber *et al.*, 2019). Tyto E3 lze rozdělit několika skupin v závislosti na jejich ubikvitinacích doménách. Nejpočetnějšími skupinami jsou E3 ligázy typu RING (Really Interesting New Gene) a HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus). Zatímco RING E3 ligázy fungují jako alosterické aktivátory E2, HECT E3 ligázy katalyzují ubikvitinaci substrátu ve dvoustupňové reakci, během které dochází ke vzniku meziprojektu Ub-E3 (Ciechanover *et Kwon*, 2017; Weber *et al.*, 2019).



Obr. 2: Detailní proces ubikvitinace. Ubikvitin aktivující enzymy (E1) vytváří thioesterovou vazbu s ubikvitinem v reakci, která vyžaduje ATP. Ubikvitin se dále přenáší na ubikvitin konjugující enzymy (E2), se kterými tvoří novou vysokoenergetickou thioesterovou vazbu. Ubikvitin ligační enzymy (E3) zajistí rozpoznání substrátu a katalyzují kovalentní připojení ubikvitinu k cílovému substrátu prostřednictvím isopeptidové vazby. Polyubikvitinovaný substrát je posléze dopraven do 26S proteazomu k degradaci. Vytvořeno v Biorender.com dle Gong *et al.*, 2016.

Účinek ubikvitinujících enzymů může být revertován působením deubikvitinujících

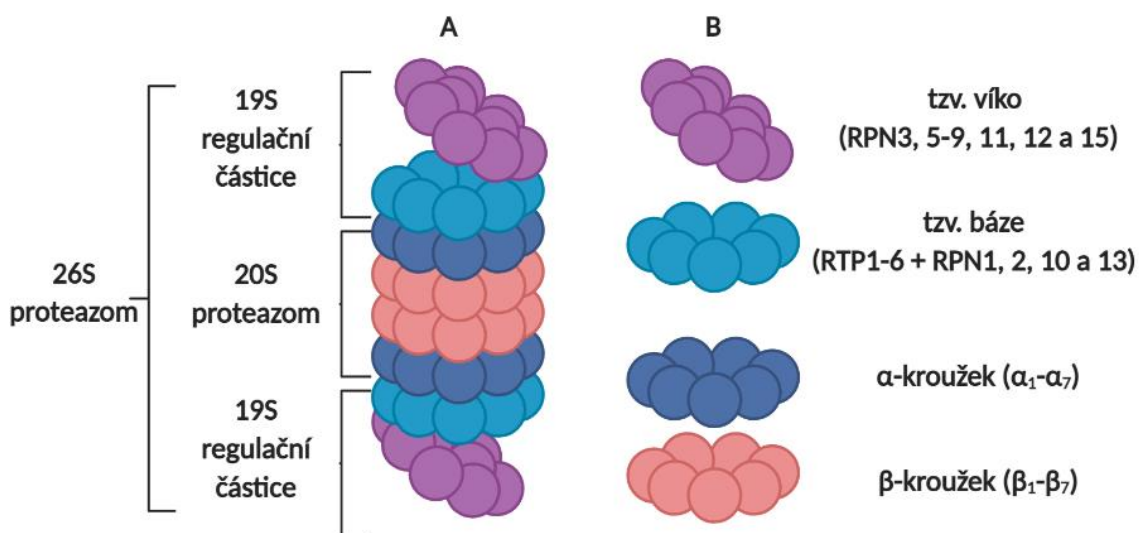
enzymů (DUBs), které jsou schopné odstranit ubikvitin z polyubikvitinovaných substrátů (Borissenko *et* Groll, 2007). Enzymy DUBs mohou být volné, ale řada z nich je také součástí některých komplexů, například 26S proteazomu. Některé z deubikvitinačních enzymů jsou součástí regulační podjednotky proteazomu, kde hrají důležitou roli při degradaci proteinů. Polyubikvitinový řetězec proteinového substrátu je těmito DUBs rozpoznáván a je převeden na monomery ubikvitinu. Deubikvitinace zprostředkovaná těmito enzymy hraje důležitou regulační roli v různých buněčných událostech (Tsukamoto *et* Yokosawa, 2010). Polyubikvitinované řetězce generované *de novo* ubikvitin-ligačními enzymy nebo uvolňováním z polyubikvitinovaných substrátů prostřednictvím DUBs se v buňkách společně s volným ubikvitinem vyskytují ve významném množství. Akumulace nadměrných hladin těchto ubikvitinových řetězců však může inhibovat procesy závislé na ubikvitinu, zejména proteazomální proteolýzu. Proto je nezbytná regulace v množství ubikvitinu, na kterém se rovněž podílí deubikvitinační enzymy (Amerik *et* Hochstrasser, 2004).

3.1.2 Proteazom

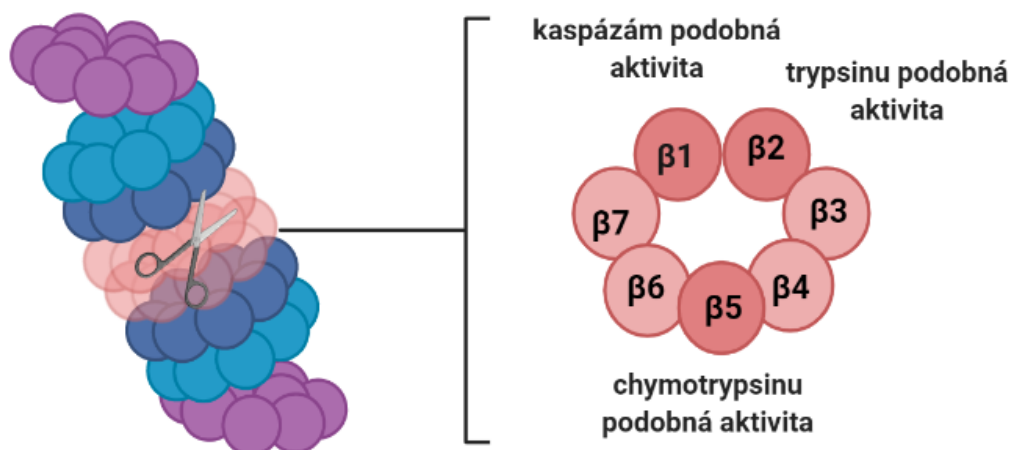
26S proteazom je proteáza závislá na ATP, která se nachází ve všech eukaryotických buňkách. Tento proteinový komplex je centrální proteázou ubikvitin-dependentní dráhy degradace proteinů, a jako takový má klíčovou roli v mnoha buněčných procesech, včetně kontroly buněčného cyklu, regulace transkripce a prezentace antigenů (Walz *et al.*, 1998; Bedford *et al.*, 2010). Proteazom se nachází v jádru a cytozolu všech buněk a tvoří přibližně 1 až 2% buněčné hmoty (Lecker *et al.*, 2006). Skládá se ze dvou komplexů (**Obr. 3A**) – katalytické centrální části s molekulovou hmotností přibližně 750 kDa (CP, core particle; také známé jako 20S proteazom) a jedné nebo dvou terminálních 19S regulačních podjednotek (RP, regulatory particle(s)) s molekulovou hmotností přibližně 700 kDa, které slouží jako aktivátory proteazomu. Regulační podjednotky se váží na jeden nebo oba konce latentního 20S proteazomu za vzniku enzymaticky aktivního 26S proteazomu. (Walz *et al.*, 1998; Tanaka, 2009).

20S proteazom degraduje ubikvitinované proteiny na oligopeptidy o délce 3–15 zbytků aminokyselin. Výsledné peptidové produkty jsou následně hydrolyzovány na aminokyseliny oligopeptidázami nebo aminokarboxylovými peptidázami (Tanaka, 2009). Sestavený 20S proteazom (**Obr. 3A a B**) má tvar válce, který je výsledkem složení dvou vnitřních β -kroužků a dvou vnějších α -kroužků, které jsou tvořeny sedmi strukturně podobnými podjednotkami α a β . Kroužky jsou uskupeny do kompaktní struktury v pořadí podjednotek $\alpha_{1\rightarrow7}\beta_{1\rightarrow7}\beta_{1\rightarrow7}\alpha_{1\rightarrow7}$ (Tanaka, 2009; Bedford *et al.*, 2010). 20S proteazom je klasifikován jako threoninová proteáza, která obsahuje dva páry tří různých katalytických míst (**Obr. 4**). Podjednotky β_1 , β_2 a β_5 obsahují katalytická místa s kaspázám podobnou aktivitou, s trypsinem podobnou aktivitou a chymotrypsinem podobnou aktivitou. Tyto aktivity jsou schopné hydrolyzovat proteiny na oligopeptidy (Tsukamoto *et* Yokosawa, 2010).

Regulační částice rozpoznávají polyubikvitinované proteiny. Řetězce polyubikvitinu jsou z těchto proteinů regulačními částicemi odstraněny a zachycen je jen samotný substrátový protein. Ten je následně prostřednictvím regulačních podjednotek rozvolněn a dále translokován do 20S proteazomu k destrukci (Borissenko *et Groll*, 2007; Tanaka, 2009). Strukturně jsou regulační částice tvořeny z přibližně 20 různých podjednotek, které mohou být rozděleny do dvou skupin dle obsahu ATPáz na RPT a RPN podjednotky (**Obr. 3B**). Většina RPN (Regulatory Particle of Non-ATPase) podjednotek vytváří komplex tzv. víka, který se podílí na zachycení substrátu a deubikvitinaci. Zbylé RPN podjednotky spolu s podjednotkami RTP (Regulatory Particle of Triple-ATPase) vytváří základní komplex, tzv. bázi, která má kromě funkce zachycení a rozložení substrátu za úkol otevřít vstup do 20S proteazomu prostřednictvím interakce s jeho α -kroužkem (Tanaka, 2009; Bedford *et al.*, 2010).



Obr. 3: Struktura proteazomu. (A) 26S proteazom se skládá ze 2 částí – 20S proteazomu, který tvoří jeho jádro, a 19S regulačních částic, které jsou jeho aktivátory. (B) Tělo 20S proteazomu je tvořeno α - a β -kroužky a u 19S regulační částice rozlišujeme strukturu tzv. víka (směřujícího vně proteazomu) a tzv. báze (nasedající na 20S proteazom). Vytvořeno v BioRender.com dle Murata *et al.*, 2009.



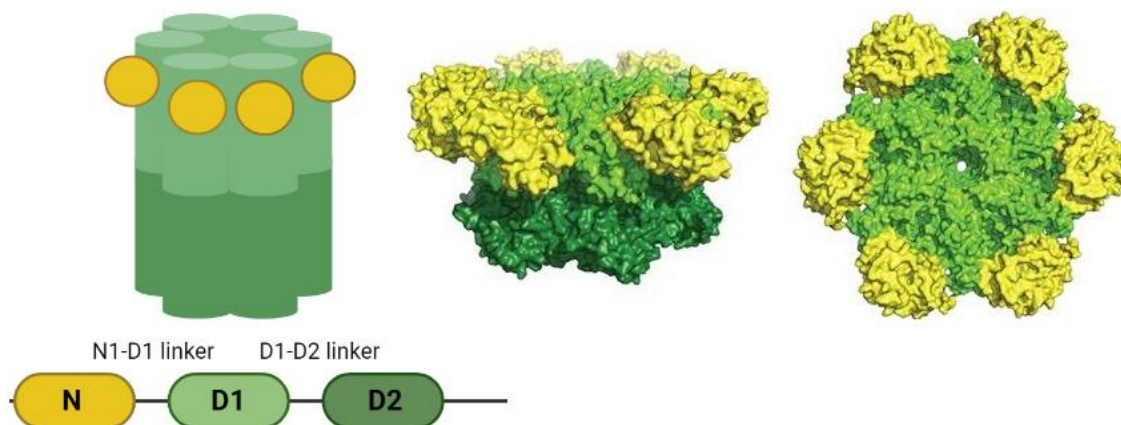
Obr. 4: Proteolytická místa v proteazomu 20S. V proteazomu 20S jsou tři typy proteolytických míst a každý β -kroužek tato tři aktivní místa (s kaspázám podobnou aktivitou, s trypsinu podobnou aktivitou a s chymotrypsinu podobnou aktivitou) obsahuje. Vytvořeno v Biorender.com dle Goldberg, 2012.

3.1.3 Další důležité složky UPS

Všechny aspekty homeostázy buněčných proteinů závisí na molekulárních chaperonech. Chaperony podporují skládání nově syntetizovaných polypeptidů, jejich translokaci přes membrány a opětovné složení substrátů denaturovaných stresem. Hrají také klíčovou roli při prevenci agregace a při cílení špatně složených proteinů pro degradaci. Specializovaná třída chaperonů, hexamerické AAA-ATPázy, mohou extrahovat chybně složené proteiny z agregátů způsobem závislým na ATP (Chen *et al.*, 2011a). ATPázy asociované s různými buněčnými aktivitami (známé pod zkratkou AAA+ proteiny; ATPases Associated with diverse cellular Activities) tvoří velkou a rozmanitou rodinu nacházející se ve všech organismech. Je to početná rodina NTPáz (nukleosid trifosfatáz), která je charakterizována konzervovanou nukleotid-vazebnou a katalytickou doménou, tzv. AAA+ doménou (Snider *et al.*, 2008). Jedním z nejstudovanějších proteinů AAA+ rodiny je ATPáza P97, známá také pod zkratkou VCP (Valosin-Containing Protein) nebo jako CDC48 v kvasinkách, která se podílí na velkém množství buněčných aktivit ve spolupráci s různými adaptorovými proteiny (Meyer *et al.*, 2000).

Protein P97 byl poprvé objeven J. M. Petersem *et al.* roku 1990 a od té doby mu bylo přiřazeno mnoho funkcí a rolí (Peters *et al.*, 1990; Boom *et Meyer*, 2018). Je ústřední složkou v UPS, kde působí jako molekulární chaperon, který ve spolupráci s dalšími kofaktory umožňuje transport polyubikvitinových proteinových substrátů k recyklaci nebo degradaci v 26S proteazomu. (Kloppsteck *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, 2012). Každý protomer P97 ve své struktuře (**Obr. 5**) obsahuje N-terminální doménu (N-doména), dvě ATPázové domény v tandemu (D1 a D2) a krátkou C-koncovou oblast (Le *et al.*, 2016). P97 se sestavuje do

homohexamerické struktury, ve které jsou domény D1 a D2 naskládány na sebe a tvoří útvar podobný barelu. Axiální kanál vyplývající z hexamerické organizace se používá k translokaci substrátů. Doména D1 zprostředkovává sestavení hexameru a vykazuje velmi nízkou aktivitu ATPázy, naopak doména D2 přispívá k hlavnímu podílu aktivity ATPázy v tomto proteinu. Spojovací oblast (linker) mezi doménami D1 a D2 je důležitá pro aktivitu ATPázy a současně umožňuje asymetrické sestavení P97 (Vekaria *et al.*, 2016).



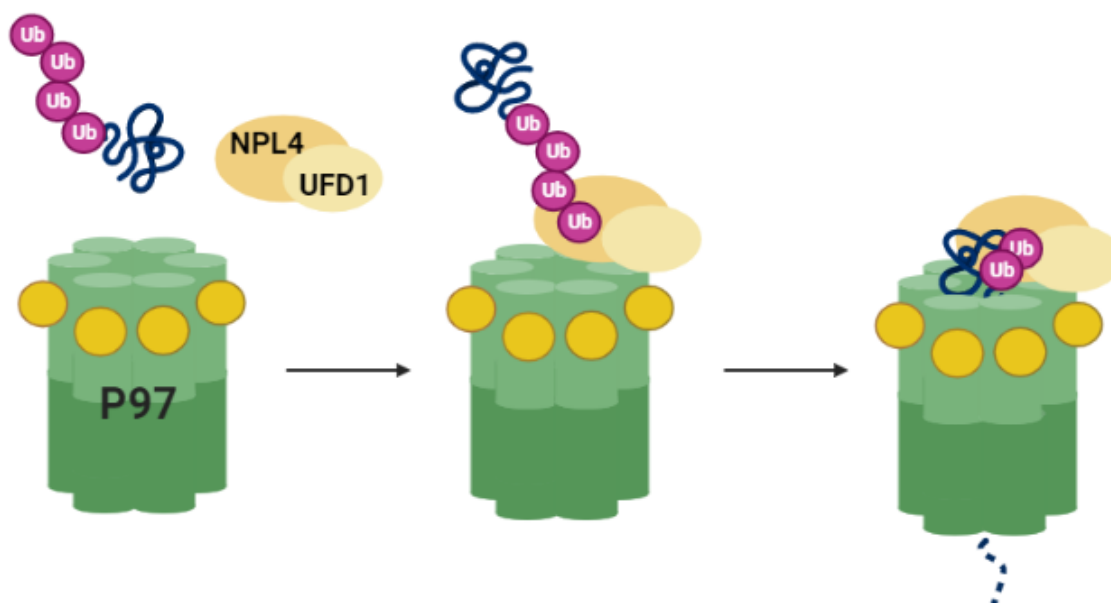
Obr. 5: Architektura proteinu P97. Vlevo schéma architektury P97 doplněné o organizaci domén (C-terminální oblast není v obrázku znázorněna). Vpravo boční a horní pohled na strukturu P97 z kryo-elektronové mikroskopie. Vytvořeno v BioRender.com dle Stach *et al.*, 2017.

P97 využívá řadu kofaktorů, které napomáhají jeho buněčným funkcím (Vekaria *et al.*, 2016). Přímou, nebo nepřímou skrze pomocné proteiny, se na něj váže asi 30 kofaktorových proteinů. Kofaktory fungují jako substrátové a ubikvitinové adaptory, regulátory nebo modulátory různých metabolických aktivit (Boom *et al.*, 2018). Adaptorové proteiny se vážou převážně do N-terminální domény, v menší míře i na C-koncovou oblast, a tím realizují funkční diverzitu P97 (Le *et al.*, 2016). P97 interaguje s ubikvitinovanými substráty prostřednictvím rozmanité sady ubikvitinových adaptorů, které obsahují ubikvitin vazebnou doménu (UBD), P97-vazebnou doménu (UBX) nebo UBX-podobnou (UBX-L) doménu (Vekaria *et al.*, 2016). Dvěma hlavními a vzájemně kompetujícími adaptory jsou protein P47 a komplex UFD1-NPL4 (Ubiquitin Fusion Degradation 1–Nuclear Protein Localization 4; UN), přičemž oba adaptory dramaticky zvyšují schopnost P97 vázat se na ubikvitinované konjugáty (Meyer *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2002).

Protein P47 se podílí na opětovném sestavení endoplazmatického retikula, jaderného obalu a Golgiho aparátu (Meyer *et al.*, 2000). Jeho vazba na ubikvitin je zprostředkována doménou UBA (s ubikvitinem asociovaná doména) nacházející se na N-konci proteinu. Tento

UBA motiv je pro vazbu ubikvitinu nezbytný. Protein P47 však může ubikvitin vázat pouze tehdy, je-li sám přítomen v komplexu s P97, což naznačuje, že vazba na P97 aktivuje v proteinu P47 vazebné místo pro ubikvitin. Komplex P97-P47 má vysokou specifickou zejména pro monoubikvitinované substráty (Meyer *et al.*, 2002).

Vazba ubikvitinu komplexem UFD1-NPL4 je od vazby samotným P47 regulována odlišně. Na rozdíl od P47 se může komplex UFD1-NPL4 vázat na polyubikvitinované proteiny, a může tak navíc činit nezávisle na P97, který může být posléze do konjugátu navázán (Meyer *et al.*, 2002). NPL4 a UFD1 však mohou tvořit heterodimer také v nepřítomnosti P97 nebo polyubikvitinovaného substrátu (Sato *et al.*, 2019). UFD1-NPL4 byl původně charakterizován při degradaci spojené s endoplazmatickým retikulem (ERAD; Endoplasmic Reticulum Associated Degradation). S rostoucím počtem studií se však ukázalo, že je zapojen do proteazomální degradace nejen proteinů z endoplazmatické membrány, ale také proteinů pocházejících z jádra, mitochondriální membrány, ribozomů nebo cytozolu (Le *et al.*, 2016). Elektronovou mikroskopií bylo prokázáno, že se UFD1-NPL4 váže s P97 v poměru 1:6 (**Obr. 6**), kdy jeden podlouhlý heterodimer UFD1-NPL4 nasedá na periferní oblast hexamerového kruhu P97 (Pye *et al.*, 2007). Savčí protein NPL4 obsahuje specifickou ubikvitin vazebnou doménu, tzv. NZF (NPL4 Zinc Finger) motiv, prostřednictvím které rozpoznává řetězce ubikvitinů připojené k proteinovému substrátu, a tím zprostředkovává první reakční krok (Sato *et al.*, 2019). Dále disponuje putativní doménou zinkového prstu (ZF-NPL4) v konzervativní oblasti od 113-255 aminokyseliny. Tato oblast je zodpovědná pro vazbu proteinového kofaktoru UFD1 (Lass *et al.*, 2008).



Obr. 6: Model pro aktivitu P97. P97 tvoří komplex s UDF1-NPL4 a polyubikvitinovaným substrátem. Ubikvitin je odstraněn přidruženým kofaktorem s DUB aktivitou (např. ATX3) a ponechány jsou pouze K48-polyubikvitinové řetězce udávající značku pro degradaci substrátu. Substrát je provlečen středovým pórem P97 a rozložen. Vytvořeno

v Biorender.com dle Vaz *et al.*, 2013 a Stach *et* Freemont 2017.

3.2 UPS jako terapeutický cíl při léčbě rakoviny

3.2.1 Role proteazomu během rakoviny

UPS hraje důležitou roli jak v buněčné proliferaci, tak v přežití buněk. Reguluje přeměnu klíčových proteinů podílejících se na progresi buněčného cyklu, jako jsou cykliny, p27 nebo p53, a hraje také zásadní roli při regulaci jedné z nejdůležitějších cest přežití buněk, dráhy NF- κ B (Nukleární Faktor Kappa B) (Shen *et al.*, 2013). Vzhledem k důležitosti proteazomu ve vícero buněčných procesech je zřejmé, že jeho aktivace nebo inhibice ovlivní mnoho životně důležitých buněčných funkcí (Huang *et* Chen, 2009). Aberace a defekty v UPS dráze jsou spojeny s řadou chorob včetně rakoviny. Některá onemocnění jsou způsobena prodlouženou životností proteinů, zatímco jiná jsou způsobena zrychlenou degradací proteinů (Bešše *et al.*, 2014; Kors *et al.*, 2019). Neurodegenerativní poruchy a srdeční dysfunkce souvisejí s akumulací proteinů nebo se sníženou proteazomovou aktivitou. Naopak procesy zvyšující proteazomovou aktivitu a indukci exprese souvisejících proteazomových složek jsou zapojeny do buněčného chřadnutí a několika typů rakovin (Huang *et* Chen, 2009; Kors *et al.*, 2019). Rakovina je charakterizována nekontrolovanou buněčnou proliferací a selháním buněk v apoptóze. Protože proteazom je důležitým regulátorem obou těchto procesů, mohou terapeutické režimy pro manipulaci s proteazomální aktivitou u některých pacientů s rakovinou potenciálně obnovit přirozenou buněčnou homeostázu (Almond *et* Cohen, 2002).

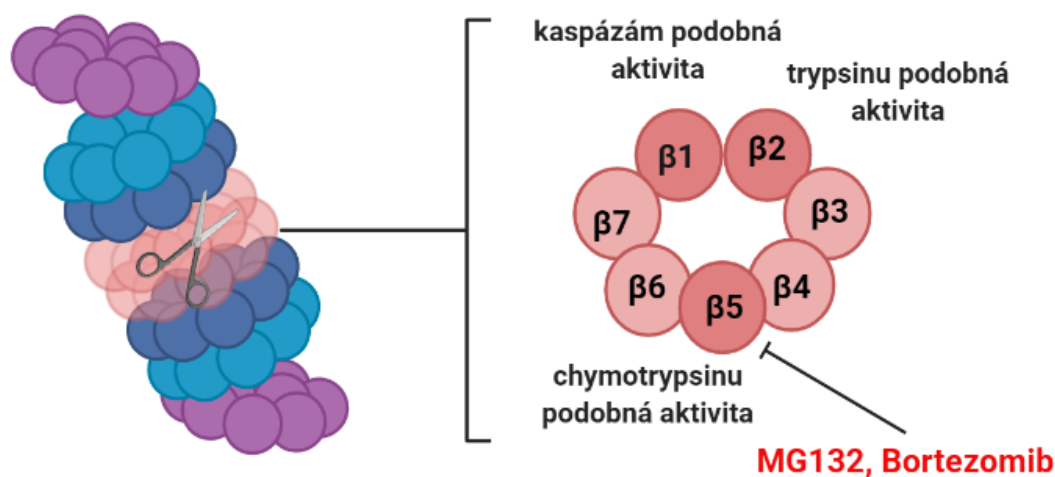
Pro buňku je nezbytné, aby proteazomový systém správně fungoval, což zdůrazňuje mimo jiné i jeho využití jako terapeutického cíle (Huang *et* Chen, 2009; Kors *et al.*, 2019). Buňky mají vlastní přirozené mechanismy pro inhibici a aktivaci proteazomu, pomocí nichž se vyrovnávají se stresovými podmínkami. Tyto proteazomové modulace zahrnují změny ve složení proteazomových komplexů, posttranslační modifikace nebo alterace na úrovni transkripce (Kors *et al.*, 2019). Rakovinné buňky využívají UPS k dosažení aberantního růstu a rezistenci k apoptóze, což dělá z UPS jedinečný selektivní cíl pro objevování nových léků (Shen *et al.*, 2013). Regulátory UPS dráhy zabraňují proliferaci maligních buněk (Bešše *et al.*, 2014) a inhibitory proteazomu silně indukují apoptózu u mnoha typů rakovinných buněk a vykazují sníženou cytotoxicitu v buňkách normálních (Almond *et* Cohen, 2002).

3.2.2 Terapeutické přístupy v léčbě rakoviny využívající inhibici UPS

Jelikož je u rakovin detekována zvýšená proteazomální aktivita, vyvíjejí se proteazomální inhibitory specificky navržené tak, aby inhibovaly enzymatickou aktivitu podjednotek β 1, β 2 a β 5

(Shen *et al.*, 2013; Tsukamoto *et Yokosawa*, 2010).

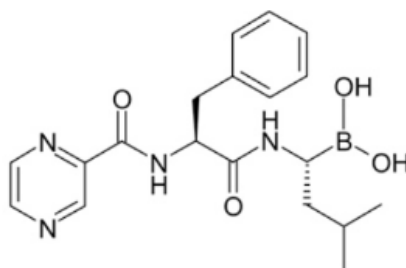
Na konci 80. let Goldberg, objevitel proteazomu, se svou výzkumnou skupinou prokázali, že nadměrná proteolýza, spojená se ztrátou svalů u mnoha modelů hlodavců (rakovina, svalová atrofie, selhání ledvin), byla způsobena především aktivací ubikvitin-proteazomové dráhy, o které se do té doby věřilo, že degraduje pouze špatně složené nebo regulační proteiny. Tyto poznatky jej vedly k návrhu, že by pro mnoho pacientů mohlo být prospěšné farmakologicky inhibovat tento degradační proces, konkrétně ve svalu (Goldberg, 2012). V roce 1993 Goldberg a jeho kolegové založili společnost MyoGenetics s cílem vyvinout látky blokující oslabující ztrátu svalů při rakovině a jiných nemocech. Několik sloučenin, kterými se Goldbergova výzkumná skupina zabývala, bylo hlavními sloučeninami vedoucími k syntéze Bortezomibu, např. MG132 (Teicher *et Tomaszewski*, 2015). Prvními syntetizovanými inhibitory proteazomu byly jednoduché peptidové aldehydy, analoga substrátů aktivního místa $\beta 5$ podjednotky mající chymotrypsinu podobnou aktivitu (**Obr. 7**). Tyto inhibitory byly syntetizovány na základě tehdy dostupných znalostí substrátové specifity aktivních míst proteazomu. Jedním ze zkoumaných peptidových aldehydů byl pod zkratkou MG132 výše zmíněný karbobenzyl-Leu-Leu-Leu-aldehyd. Pro zvýšení účinnosti, selektivity a stability této sloučeniny zavedl Julian Adams místo aldehydu boritanovou „hlavici“, která zvýšila účinnost látky 50–100krát. Posléze, během několika měsíců, byl roku 1995 dalšími modifikacemi v peptidové páteři pod zkratkou MG341 generován Bortezomib (Goldberg, 2012).



Obr. 7: Znázornění inhibice aktivního místa $\beta 5$ Bortezomibem. Bortezomib a MG132 působí primárně na katalytické místo s chymotrypsinu podobnou aktivitou ($\beta 5$ podjednotka), ale ve vysokých koncentracích také inhibují kaspázám podobné místo ($\beta 1$ podjednotka). Vytvořeno v BioRender.com dle Goldberg, 2012.

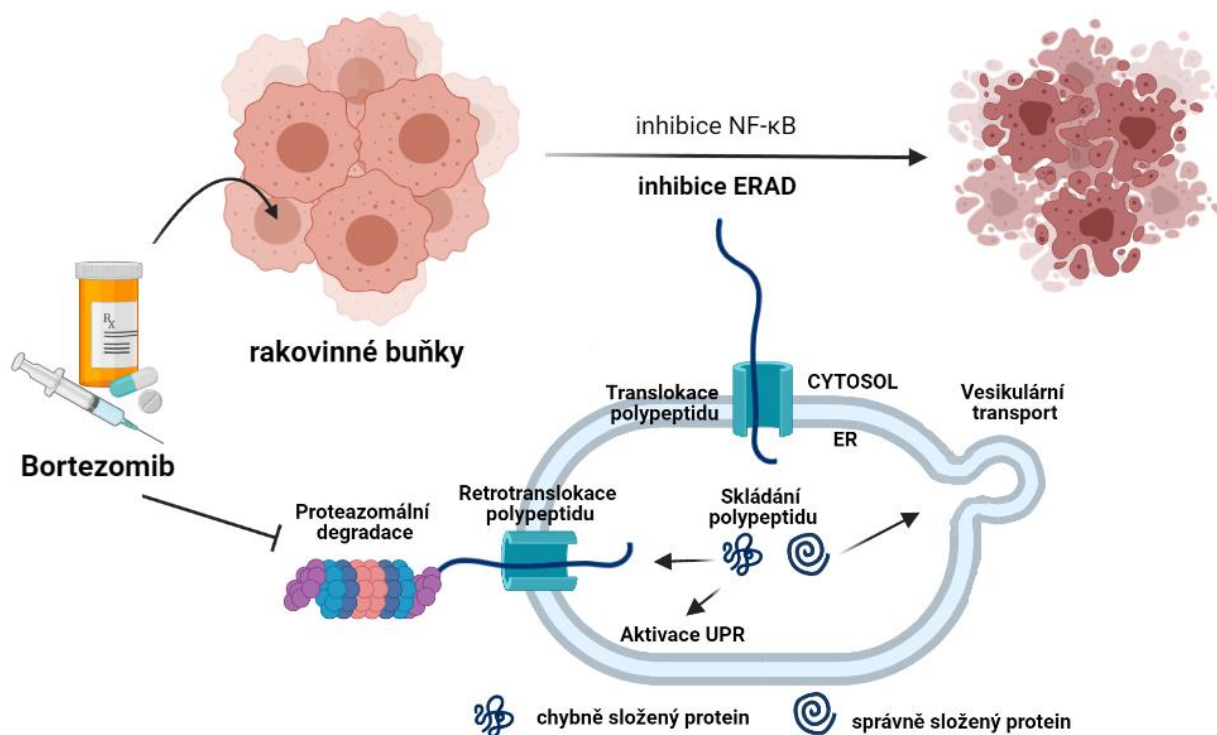
Bortezomib (**Obr. 8**), známý také pod označením PS-341 a komerčním názvem Velcade

(Millenium Pharmaceuticals), je po chemické stránce dipeptidylový derivát kyseliny borité se sumárním vzorcem C₁₉H₂₅BN₄O₄ (Bešše *et al.*, 2013). V řadě nádorových buněčných linií prokázal značnou indukční apoptickou aktivitu, která byla pozorována také na zvířecích modelech. Roku 2003 byl Bortezomib Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA; Food and Drug Administration) schválen pro pacienty s recidivujícím mnohočetným myelomem (MM). Později bylo jeho použití rozšířeno pro léčbu nově diagnostikovaných pacientů s MM, a roku 2014 také pro léčbu pacientů s lymfomem plášťových buněk (MCL; Mantle-Cell Lymphoma) (Kumari *et al.*, 2018). Po intravenózní injekci je Bortezomib schopen se rychle distribuovat z plazmy téměř do všech tkání kromě tukové a mozkové, kde se s poločasem rozpadu více než 40 hodin rozkládá. Bortezomib je metabolizován primárně prostřednictvím intracelulární oxidační deboronace zprostředkované enzymy cytochromu P450. Je to právě skupina kyseliny boronové, která se váže a tvoří komplex s hydroxylovou skupinou threoninu v aktivním místě β5 podjednotky proteazomu, čímž blokuje chymotrypsinu podobnou aktivitu, která je zodpovědná za indukci buněčné smrti (Accardi *et al.*, 2015; Teicher *et* Tomaszewski, 2015).



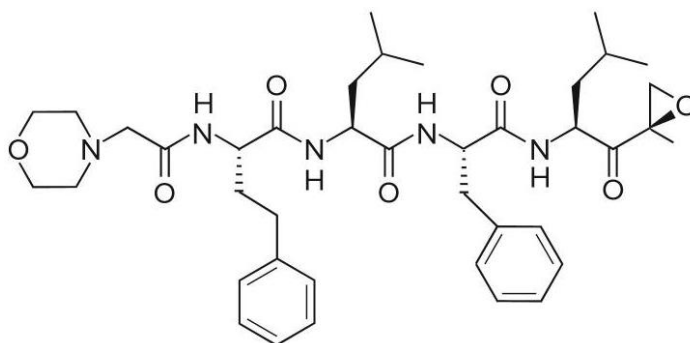
Obr. 8: Chemická struktura Bortezomibu. Převzato z Bešše *et al.*, 2013.

Je známo, že inhibice proteazomu ovlivňuje téměř veškeré buněčné pochody (**Obr. 9**). Původně se předpokládalo, že zásadní roli hraje Bortezomibem zprostředkovaná inhibice NF-κB (Nukleární Faktor Kappa B). Tato domněnka byla vyvrácena (Wu, 2012) a nyní je již známo, že zásadním faktorem určujícím specifickou toxicitu Bortezomibu vůči mnohočetnému myelomu (MM) je narušení proteostázy. Mnohočetný myelom se totiž vyznačuje extrémně vysokou produkcí proteinů, konkrétně imunoglobulinů. Tato extrémně rychlá proteosyntéza je však také spojena s tvorbou značného množství špatně nasyntetizovaných nebo sestavených proteinů, které je třeba odstranit. Odstranění takových proteinů zprostředkovává degradační dráha ERAD (Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation), jejíž ústřední složkou je proteazom. V buňkách ovlivněných Bortezomibem dochází k akumulaci těchto defektních proteinů, která ústí ve stres endoplazmatického retikula (ER-stres) a aktivaci UPR (Unfolded Protein Response) vedoucí k apoptóze (Goldberg, 2012).



Obr. 9: Mechanismy účinku Bortezomibu, kterými je indukována smrt v myelomových buňkách. Zaprvé se jedná o inhibici NF- κ B, čímž dojde k inhibici produkce růstových faktorů a cytokinů a stimulaci apoptózy. Zadruhé se jedná o inhibici dráhy ERAD, která je nezbytná k odstranění abnormálních proteinů, v myelomových buňkách zejména imunoglobulinů. Inhibicí ERAD dochází k akumulaci chybně složených proteinů, která ústí v ER-stres a aktivaci UPR. Vytvořeno v BioRender.com dle Goldberg 2012 a Qi *et al.*, 2017.

Protože se však u některých léčených pacientů vyvinula rezistence k Bortezomibu, byly vyvinuty proteazomové inhibitory druhé generace, které tuto rezistenci překonávají. Druhá generace proteazomových inhibitorů, jako je Carfilzomib, Marizomib, Ixazomib, Oprozomib a Delanzomib, se liší chemickou strukturou, biologickými vlastnostmi a mechanismy účinku (Accardi *et al.*, 2015). Carfilzomib (PR-171, komerčním názvem Kyprolis) je tetrapeptidový epoxyketonový analog epoxomicinu, člen rodiny přírodních proteazomových inhibitorů z epoxyketonu (**Obr. 10**). Ireverzibilně se váže na katalytické podjednotky proteazomu s chymotrypsinu podobnou aktivitou, takže obnovení proteazomové funkce je možné pouze syntézou nových jednotlivých podjednotek. Ve vysokých dávkách také inhibuje katalytická místa podjednotek s trypsinu a kaspásam podobnými aktivitami. Na rozdíl od Bortezomibu, který inhibuje i jiné serinové proteázy, se Carfilzomib ireverzibilně váže pouze s proteazomem, čímž zajišťuje větší specifitu a selektivitu (Accardi *et al.*, 2015). Roku 2012 byl Carfilzomib schválen FDA v roce 2012 pro léčbu pacientů s recidivujícími a refrakterními MM, u kterých se vyvinula rezistence k Bortezomibu (Kumari *et al.*, 2018).



Obr. 10: Chemická struktura Carfilzomibu. Převzato z Perel *et al.*, 2016.

Ačkoli Bortezomib a Carfilzomib vykazují slibné účinky v klinické praxi, nelze zanedbat fakt, že oba vykazují také řadu vedlejších účinků (Kumari *et al.*, 2018). Nejčastějšími vedlejšími účinky projevujícími se u více než 30% uživatelů po léčbě Bortezomibem jsou astenické stavy (únava, generalizovaná slabost), gastrointestinální příhody (nauzea, průjem, zvracení, špatná chuť k jídlu), hematologická toxicita (snížený počet krevních destiček erytrocytů), periferní neuropatie charakterizovaná parestézií (z necitlivění a mravenčení rukou a nohou) a výskyt pásového oparu. Mezi méně časté nežádoucí účinky patří bolesti hlavy, nespavost, bolest kloubů, artralgie, myalgie, otoky obličeje, rukou nebo nohou (Chen *et al.*, 2011b).

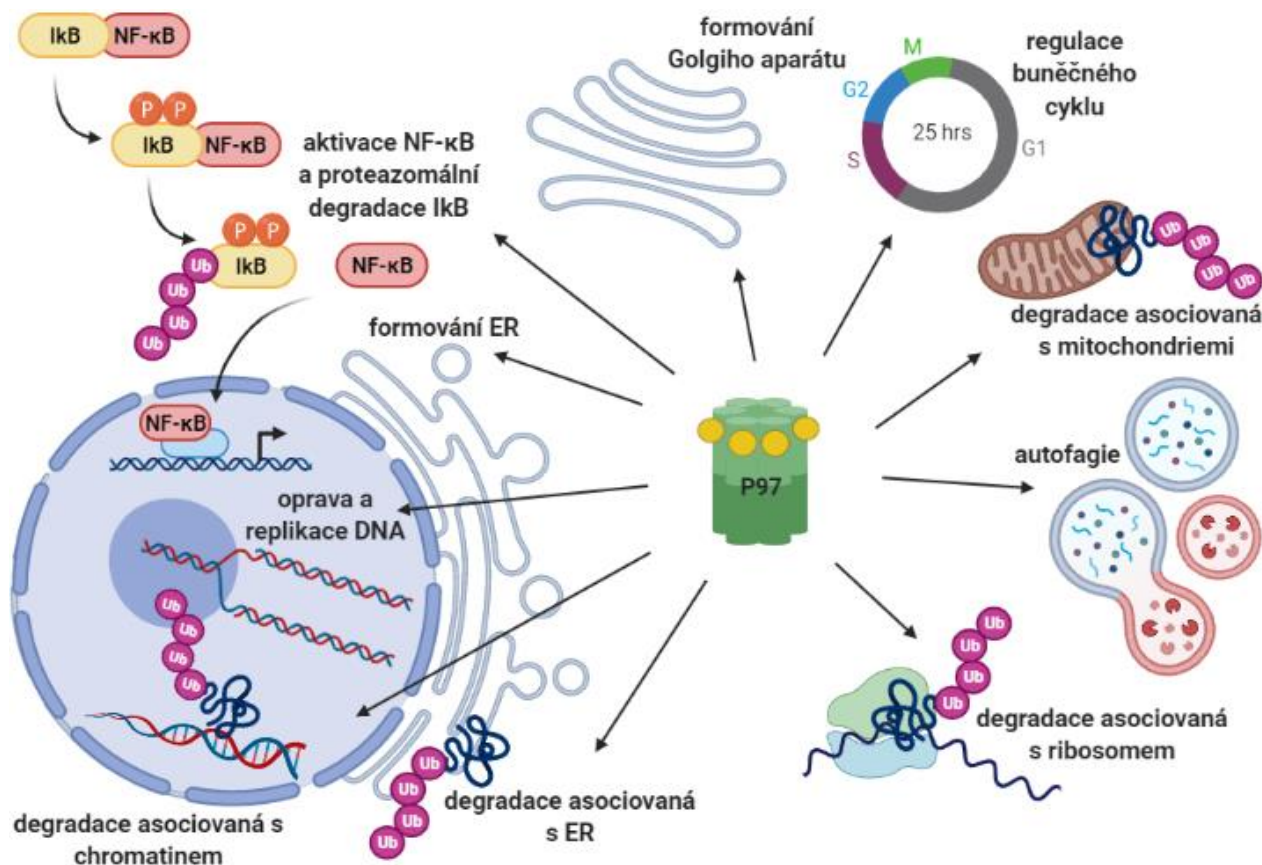
Kromě vedlejších účinků se inhibitory proteazomu potýkají ještě s dalším problémem. Přestože se úspěšně používají k léčbě hematologických malignit, neprokazují klinickou účinnost v solidních nádorech ani samostatně, ani v kombinaci s jinými terapiemi (Deshaies, 2014; Dou *et al.*, 2014).

3.2.3 Role P97 v rakovinných buňkách

Rakovinné buňky jsou závislé na mnoha ne-onkogenních vlastnostech, které jim umožňují prosperovat. Proteotoxický stres je jedním z takových ne-onkogenních znaků, kterým jsou vystaveny všechny nádorové buňky v důsledku zvýšených genomických abnormalit a výsledné syntézy a akumulace množství špatně složených buněčných proteinů. Tato nerovnováha v množství proteinů nakonec vrcholí v proteotoxický stres (Vekaria *et al.*, 2016). Aby si rakovinné buňky zachovaly proteostázi, vyznačují se zvýšenou závislostí na mechanismech degradace proteinů. Proto mají léky, které narušují odbourávání bílkovin a spouštějí proteotoxický stres, značný potenciál pro protirakovinovou terapii. Důležitost cílení na UPS byla v klinickém prostředí prokázána úspěchem inhibitorů proteazomu při léčbě hematologických malignit, zejména mnohočetného myelomu (Wustrow *et al.*, 2013; Anderson *et al.*, 2015; Parzych *et al.*, 2019). Nedostatečná aktivita těchto inhibitorů v solidních nádorech

(Milano *et al.*, 2009; Wright, 2010) však podporuje potřebu vyvinout inhibitory jiných regulátorů homeostázy bílkovin (Shen *et al.*, 2013; Anderson *et al.*, 2015; Kumari *et al.*, 2018). Nezbytný pro obnovení proteostázy, zejména ve stresových podmínkách, je protein P97, který však v buňkách plní spoustu dalších důležitých úloh (**Obr. 11**) (Vekaria *et al.*, 2016).

Jelikož řada vnitřních i vnějších signálů (hypoxie, deregulace homeostázy, zvýšená rychlost syntézy proteinů) vede k akumulaci špatně složených proteinů a vyvolává stres endoplazmatického retikula (ER-stres), je jednou z důležitých rolí P97 účast v degradaci spojené s endoplazmatickým retikulem (ER-Associated Degradation; ERAD). Jedná se o proces, při němž jsou chybně složené proteiny, které nemohou být znovu složeny v ER, přeneseny do cytosolu a degradovány proteazomy. P97 využívá svou energii hydrolýzy ATP ke strukturální přeměně a extrakci substrátů ERAD přes membránu ER do cytosolu, a pracuje ve spojení s komplexem ER membránových proteinových kanálů (také nazývaných dislokony) a kofaktorů UFD1 a NPL4 (UN). Kromě ERAD se účastní také degradace spojené s ribozomy (RAD; Ribosome-Associated Degradation) (Ye *et al.*, 2001; Vekaria *et al.*, 2016). Překladem mRNA postrádajících stop kodon vznikají polypeptidy vázané na ribozomy. Ve spojení s UN podporuje uvolňování takových ubikvitinovaných polypeptidů z ribozomů a jejich degradaci v proteazomu (Verma *et al.*, 2013). Hromaděním aberantních peptidů by potenciálně mohlo docházet ke snížení počtu kompetentních ribozomů nebo k produkci peptidů náchylných k agregaci (Vekaria *et al.*, 2016). Také proces extrakce chybně složených peptidů z mitochondriálních membrán pro usnadnění jejich proteazomální degradace (MAD; Mitochondria-Associated Degradation) zahrnuje P97, a pro translokaci poškozených mitochondriálních proteinů využívá kofaktorový komplex UN. P97 se rovněž podílí na eliminaci poškozených mitochondrií mitofagií, což je proces, který je závislý na E3 ubikvitin ligázách (Youle *et Narendra*, 2011; Ashrafi *et Schwarz*, 2013; Vekaria *et al.*, 2016). Dále P97-UN pozitivně reguluje alternativní signální dráhu NF- κ B (Zhang *et al.*, 2015) tím, že od NF- κ B izoluje jeho kritický negativní regulátor I κ B-a (inhibitor nukleárního faktoru kappa B), čímž umožňuje jeho degradaci proteazomem a následnou aktivaci NF- κ B (Li *et al.*, 2014). P97 je nezbytný také pro fúzi autofagosomu a lysozomu a tvorbu autolysosomu (Ju *et al.*, 2009). Kromě výše uvedených procesů se P97 podílí na formování ER a Golgiho aparátu, remodelaci a degradaci chromatinu (CAD; chromatin associated degradation), opravě a replikaci DNA a regulaci buněčného cyklu (Acharya *et al.*, 1995; Vekaria *et al.*, 2016; Stach *et Freemont*, 2017). Vzhledem k jeho klíčové roli v buňkách je tak snadné si představit, že by jeho inhibice vyvolala akumulaci špatně složených proteinů nebo toxických proteinových agregátů (Vekaria *et al.*, 2016; Stach *et Freemont*, 2017).



Obr. 11: Schématické znázornění rozmanitých funkcí P97. Protein P97 se kromě degradaci spojené s proteazomovým systémem účastní celé řady dalších buněčných procesů. Zapojuje se do formování Golgihho aparátu a ER, účastní se degradace asociované s endoplazmatickým retikulem (ERAD), ribosomy (RAD), mitochondriemi (MAD) a chromatinem (CAD), rovněž má vliv na autofagii, regulaci buněčného cyklu a opravu a replikaci DNA. Vytvořeno v Biorender.com dle Meyer *et al.*, 2012; Vekaria *et al.*; 2016 a Stach *et* Freemont, 2017.

Přestože byl P97 rozsáhle studován v buněčných a živočišných systémech, kofaktory NPL4 a UFD1 zůstávají relativně málo prozkoumány (Byrne *et al.*, 2017).

3.2.4 Alternativní přístupy v léčbě rakoviny využívající inhibici P97 a jeho kofaktorů

Složky, které tvoří UPS, představují rozmanitou skupinu potenciálních protirakovinných cílů (Shen *et al.*, 2013; Kumari *et al.*, 2018). Komplex P97-UN se váže na ubikvitinem značené proteiny, extrahuje je pryč od neubikvitinovaných partnerů a dodává je do proteazomu k degradaci. Všechny složky komplexu P97-UN jsou vysoce konzervované napříč druhy a ztráta jakéhokoli z těchto proteinů naruší funkci UPS a vede k akumulaci těchto ubikvitinovaných

proteinů (Byrne *et al.*, 2017). Široké zapojení P97 do regulace proteostázy naznačuje, že jeho inhibice nabízí slibnou cestu jejímž prostřednictvím může být indukován proteotoxický stres (Zhou *et al.*, 2015), a že by jeho inhibitory mohly překonat terapeutická omezení původních inhibitorů proteazomu (Parzych *et al.*, 2019).

V reakci na zvýšené zatížení buněk vzniklé nadměrnou degradací proteinů je P97 u některých typů rakovinných buněk zvýšeně exprimován a upregulován (Stach *et al.*, 2017; Bastola *et al.*, 2018). Na základě toho byly vyvinuty jak ATP-kompetitivní, tak alosterické inhibitory P97 (Stach *et al.*, 2017). Inhibitory P97 jsou vyvíjeny jako protirakovinná terapeutická činidla, která se zaměřují na proteazomální stres rakovinných buněk podobným způsobem jako inhibitory proteazomu, a která v klinických studiích vyvolávají narušení proteostázy a smrt rakovinných buněk (Shen *et al.*, 2013; Boom *et al.*, 2018). CB-5083 z třídy kompetitivních inhibitorů P97 se specificky váže do D2 domény proteinu, čímž inhibuje jeho aktivitu, zabraňuje degradaci proteinů závislých na ubikvitinu a způsobuje buněčnou akumulaci polyubikvitinovaných proteinů (Anderson *et al.*, 2015). Ta vede k inhibici proliferace, indukci stresu endoplazmatického retikula, aktivaci UPR a apoptické dráhy buňky (Zhou *et al.*, 2015; Le Moigne *et al.*, 2017). Korelace vysoké exprese genů souvisejících s UPR a ERAD s citlivostí na CB-5083 podporuje roli UPR jako primárního hnacího mechanismu buněčné cytotoxicity tohoto inhibitoru a rozsah aktivace UPR indukované CB-5083 je navíc výrazně vyšší než rozsah vyvolaný proteazomovým inhibitorem Bortezomibem. Vzhledem k výše uvedenému došlo u CB-5083 k zařazení do dvou klinických studií I. fáze, u pacientů s relabujícím a refrakterním mnohočetným myelomem (NCT02223598) a u pacientů s pokročilými solidními nádory (NCT02243917) (Anderson *et al.*, 2015). Navzdory své slibné protirakovinné aktivitě CB-5083 v těchto klinických testech selhal kvůli nežádoucím účinkům, a je proto vyžadováno další zlepšení tohoto inhibitoru (Tang *et al.*, 2019). Také některé alosterické inhibitory, například NMS873, inhibují P97 se srovnatelnou účinností jako CB-5083 a vyvolávají v buňkách antiproliferativní odezvy, ale doposud nemají charakter léčiv (Stach *et al.*, 2017).

Jelikož je rakovina jednou z hlavních příčin úmrtnosti na celém světě, zaměřuje se výzkum také na vývoj nových cílených protirakovinných léčiv. Ten sice napomáhá snižovat úmrtnost na rakovinu, ale translace takových léčiv do klinické praxe je velmi pomalá a průměrně vyžaduje 13 let výzkumu. Rovněž je vývoj nových léčiv a jejich uvedení na trh finančně nákladný (Cvek, 2012; Zhang *et al.*, 2020). Velkou výzvou v léčbě rakoviny představuje rovněž nádorová rezistence. Protože některé pokročilé nádory vykazují rezistenci vůči standardním léčivým přípravkům i nově se objevujícím cíleným léčivům, těší se velkému zájmu opětovné využití léčiv již schválených pro jiné indikace (tzv. Repurposing drugs), které vykazují protirakovinnou aktivitu (Pantziarka *et al.*, 2014; Škrott *et al.*, 2017; Dinić *et al.*, 2020). Mezi slibné léky s protirakovinnou je řazen Disulfiram (tetraethylthiuramdisulfid, DSF; známý pod komerčním

názvem Antabus), používaný při léčbě závislosti na alkoholu (Shen *et al.*, 2001), který prokázal protinádorovou aktivitu v preklinických modelech a následně i během klinické studie využívající diethyldithiokarbamát (ditiokarb, DTC) jako adjuvantní imunoterapii u vysoce rizikového karcinomu prsu (Dufour *et al.*, 1993). V těle je DSF metabolizován na DTC a další metabolity, z nichž některé inhibují jaterní aldehyddehydrogenázu (Shen *et al.*, 2001). Reaktivní metabolit disulfiramu DTC vytváří komplexy s kovy, zejména pak s mědí. Komplex DTC-měď (CuET) se tvoří *in vivo* a poskytuje konečný protirakovinný metabolit (Škrott *et al.*, 2017). Již dříve bylo zdokumentováno, že komplex DSF-měď je vysoce cytotoxický pro rakovinné buňky, zatímco normální buňky nepoškozuje (Jiao *et al.*, 2016). Jedním z navrhovaných vysvětlení protinádorových účinků DSF je souhra CuET s degradací buněčných proteinů. Cytotoxická aktivita DSF zahrnuje rychlou přeměnu DSF na CuET, který se hromadí v nádorech a indukuje fenotypové rysy sdílené s inhibitory proteazomu (např. Bortezomib), včetně hromadění polyubikvitinovaných proteinů, rychlé deubikvitinace histonu H2A a akumulace ubikvitinovaných proteinů v cytoplazmě. Po vstupu do buněk se CuET váže na NPL4 prostřednictvím domény ZF-NPL4 a indukuje jeho agregaci, což následně narušuje důležitou dráhu P97-NPL4-UFD1 a indukuje komplexní buněčný fenotyp vedoucí k buněčné smrti. Interakce CuET-NPL4 vede k rychlé tvorbě proteinových agregátů a imobilizaci tohoto jinak velmi mobilního multifunkčního proteinového komplexu. Tyto imobilizované agregáty NPL4 spouštějí reakci tepelného šoku (HSR; Heat Shock Response), ER stres a aktivují UPR, což jsou charakteristické rysy indukované CuET (Škrott *et al.*, 2017).

Další žádoucí směr v cílení na složky UPS představuje vývoj inhibitorů proti ubikvitinačním enzymům. Atraktivním cílem takových inhibitorů je ubikvitin aktivující enzym UBA1, exprimovaný ve všech eukaryotických buňkách, který navíc v rakovinných buňkách vykazuje vyšší aktivitu (Hyer *et al.*, 2018; Boer *et Biljmakers*, 2019). Je nezbytný pro životaschopnost buněk a disponuje dvěma enzymatickými aktivitami (adenylací ubikvitinu a tvorbou ubikvitin-thioesterové vazby), které mohou být obě potlačeny. Funkcí UBA1 je tedy aktivovat ubikvitin a zprostředkovat tak první krok v ubikvitinaci (Boer *et Biljmakers*, 2019). Prvním inhibitorem UBA1 byl PYR-41 (Yang *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2010), který inhiboval tvorbu thioesterové vazby mezi UBA1 a ubikvitinem. Novějším a mnohem silnějším inhibitorem je TAK-243 (označovaný také jako MLN7243). Tento adenosylsulfamát inhibuje UBA1 tím, že se váže do ATP-vazebního místa, odkud napadá na thioester vázaný ubikvitin za tvorby ubikvitin-TAK-243 aduktů, které nemohou být dále uvolňovány, čímž nedochází k další aktivaci ubikvitinu. Tento mechanismus byl nejprve objasněn pro příbuznou molekulu MLN4924 (označením také Pevonedistat), vysoce selektivní inhibitor Nedd8 E1 UBA3, indukující zastavení buněčného cyklu a apoptózu (Soucy *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2014; Boer *et Biljmakers*, 2019). MLN7243 způsobuje robustní ztrátu monoubikvitinace a polyubikvitinace, čímž narušuje proteolýzu závislou na ubikvitinu. To má za následek nadbytek proteinů v buňkách, stres ER,

zhoršenou progresi buněčného cyklu a opravu poškození DNA a může vést k apoptóze vyvolané ER. Navíc MLN7243 vykazoval podstatnou protinádorovou aktivitu v preklinických modelech, a srovnávací toxikologické studie na myších, potkaních a psích modelech prokázaly, že lze tuto látku bezpečně testovat také v humánní klinické studii na pokročilých solidních nádorech (NCT02045095). MLN7243 je cenným nástrojem pro studium ubikvitinace proteinu a poskytuje novou příležitost ke studiu modulace proteinové homeostázy a ubikvitinové signalizace při léčbě rakoviny (Hyer *et al.*, 2018).

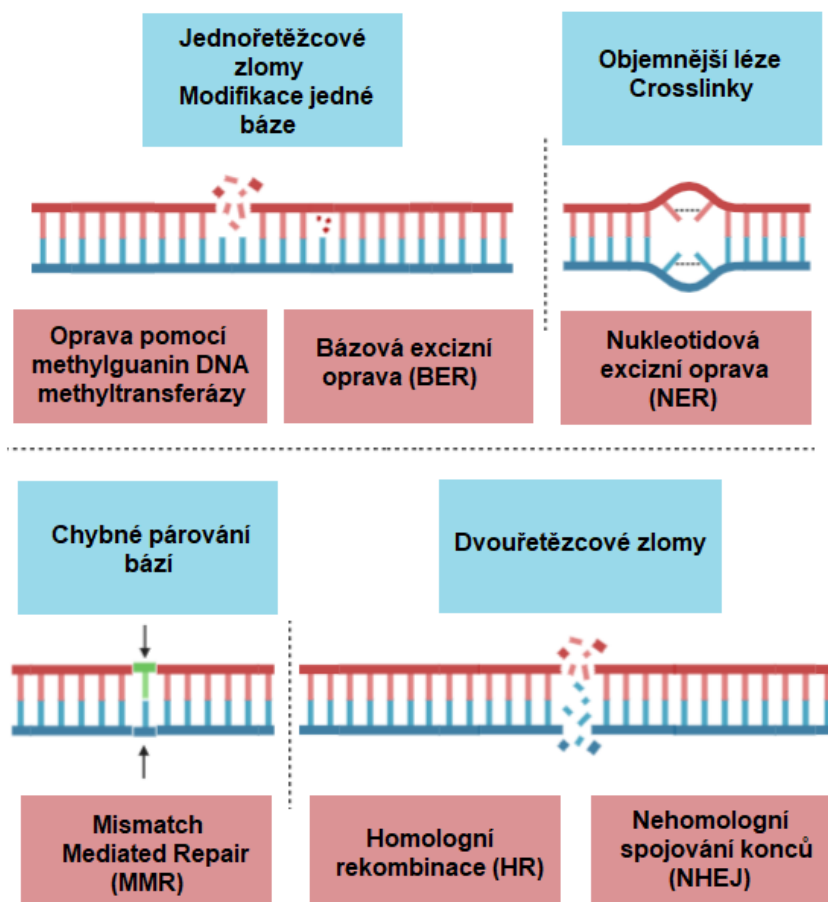
Specifičtější cíl by mohly rovněž představovat deubikvitinační enzymy (DUB), jelikož i ty jsou nedílnou součástí ubikvitin-proteazomového systému a většina rakovin prokazuje jejich pozměněnou expresi. Jejich cílení by mohlo minimalizovat toxicitu mimo terapeutický cíl, a proto je i tento přístup k regulaci UPS jednou ze současných oblastí výzkumu (Kumari *et al.*, 2018).

3.3 Obranné mechanismy buňky na poškození DNA a role UPS během těchto procesů

Buňky mnohobuněčných organismů jsou neustále vystavovány různým endogenním a exogenním zdrojům, které poškozují DNA. Tyto zdroje zahrnují reaktivní metabolity včetně reaktivních forem kyslíku a dusíku (ROS, NOS), ultrafialové záření, radiaci a chemické mutageny. Dalším zdrojem poškození DNA jsou chyby, ke kterým dochází během normálního metabolismu DNA, replikace, rekombinace a oprav DNA (Li, 2008; Smith *et al.*, 2010). Ubikvitin-proteazomový systém (UPS) je jedním z hlavních regulátorů proteostázy, a tedy i stability genomu. Již 15 sekund po indukci poškození lze v buňce detekovat masivní akumulaci ubikvitinu kolem míst poškození DNA. V reakci na poškození DNA aktivují buňky vysoce konzervovanou a komplexní signalizační síť běžně označovanou zkratkou DDR (DNA Damage Response; reakce na poškození DNA), aby byla zajištěna genomová integrita (Feng *et al.*, 2012; Brinkmann *et al.*, 2015). Signální dráhu DDR tvoří kaskáda proteinových kináz a mediátorových proteinů (Maréchal *et al.*, 2013). Skládá se ze souboru přísně regulovaných kroků, včetně detekce poškození DNA, akumulace faktorů opravy DNA v místě poškození, a nakonec fyzické opravy léze (Brinkmann *et al.*, 2015).

Široká rozmanitost typů lézí DNA vyžaduje několik z velké části odlišných mechanismů opravy DNA (**Obr. 12**). Zatímco některé léze podléhají přímé opravě zprostředkované jediným proteinem, většina je opravena sekvencí katalytických dějů zprostředkovaných více proteiny (Jackson *et al.*, 2009). Existuje pět hlavních cest oprav DNA, které mohou být aktivovány v závislosti na typu indukovaných poškození – přímá nebo reverzní oprava pomocí O⁶-methylguanin DNA methyltransferázy (MGMT), oprava chybného párování bazí (MMR; Mismatch Mediated Repair), básová-excizní oprava (BER; Base-Excision Repair), nukleotidová-

excizní oprava (NER; Nucleotid-Excision Repair) a oprava dvouřetězcových zlomů (DSBR; Double-Strand Break Repair), která zahrnuje opravu prostřednictvím homologní rekombinace (HR; Homologous Recombination) nebo opravu spojením nehomologních konců (NHEJ; Non-Homologous End Joining). Regulace těchto opravných událostí je opravdu náročná, zvláště když stresové faktory přetrvávají po dlouhou dobu (Vlachostergios *et al.*, 2009).



Obr. 12: Typy poškození DNA a jejich opravné mechanismy. Vytvořeno v Biorender.com.

O⁶-methylguanin-DNA methyltransferázy (MGMT) jsou zásadní pro opravu přirozeně se vyskytujících mutagenních DNA lézí O⁶-methylguaninu zpět na guanin a zabraňují tak potenciálnímu nesouladu a chybám v replikaci a transkripci DNA. Oprava je zprostředkována mechanismem nukleofilní substituce, při níž dochází k přenosu alkylové skupiny z léze na cysteinový zbytek aktivního místa proteinu MGMT (Kaina *et al.*, 2007). Oprava chybného párování bází (MMR, Mismatch Mediated Repair) se zaměřuje na chybně zařazené nukleotidy, které zůstaly v DNA po její replikaci. Opravný systém rozpoznává neshody v párování bází na základě identifikace matricového řetězce obsahující původní nukleotidovou sekvenci a nově syntetizovaného řetězce obsahující chybně vloženou bázi (Li, 2008; Goldstein *et al.*, 2015).

Substráty pro NER a BER jsou léze nacházející se v jednom z řetězců DNA, které jsou následně odstraněny mechanismem „cut-and-patch“. V obou případech slouží nepoškozené vlákno jako věrná šablona pro opravu poškozeného. Substráty pro BER jsou báze s malými chemickými změnami, které silně nenarušují strukturu dvojité šroubovice DNA. Takové abnormální báze jsou rozpoznávány DNA-glykosylázami štěpícími glykosidickou vazbu mezi poškozenou bází a 2-deoxyribózou, čímž vytváří abazické (apurinové/apyrimidinové) místo. To je rozpoznáváno AP-endonukleázami a vyštěpeno (Giglia-Mari *et al.*, 2011; Krokan *et Bjørås*, 2013). NER se zaměřuje na objemnější léze destabilizující dvoušroubovici DNA. Ty jsou u člověka rozpoznávány proteinem XPA (Xenoderma Pigmentosum protein A), který se následně aktivuje proteiny potřebné pro excinukleázovou aktivitu. Vyštěpený oligomer včetně léze je 24-32 nukleotidů dlouhý (Giglia-Mari *et al.*, 2011; Mladenov *et Iliakis*, 2011; Spivak, 2015).

Některé z mutagenů však ovlivňují obě vlákna indukcí dvouřetězcových zlomů DNA (DBS). Takové léze jsou extrémně cytotoxické a náročné na opravu, jelikož se buňka nemůže spoléhat na pouhé kopírování informací z nepoškozeného řetězce. Oprava DBS se spoléhá na dvě odlišné cesty – HR a NHEJ (Giglia-Mari *et al.*, 2011). NHEJ je opravná cesta náchylná k chybám, která může být využita ve všech fázích buněčného cyklu, zatímco HR je bezchybná cesta, kterou lze použít pouze v pozdní S-fázi a G2-fázi buněčného cyklu, protože vyžaduje homologní sesterskou chromatidu (Giglia-Mari *et al.*, 2011; Goldstein *et Kastan*, 2015). NHEJ modifikuje rozbité konce DNA a bez ohledu na homologii je liguje dohromady, čímž může generovat inserce nebo delece (Lieber, 2008). K opětovnému spojení dvou konců rozbité molekuly využívá koordinované akce proteinů Ku70 a Ku80, DNA-PK, Artemis, XRCC4 a DNA ligázy IV (Fan *et al.*, 2013). Oprava DSB pomocí HR je iniciována resekci konců DNA kombinovaným působením proteinového komplexu MRN, CtIP, ExoI a BLM helikázy, které katalyzují generování 3' ssDNA přesahu a tvorbu nukleoproteinového vlákna s RAD51, což je protein podílející se na hledání homologie. Po lokalizaci a invazi do homologní oblasti DNA je zahájena opravná syntéza a z každého konce DNA je generováno Hollidayovo spojení, které je na konci procesu rozvolněno komplexem resolvázy (Mladenov *et Iliakis*, 2011).

Zděděné defekty v některé z drah DDR obvykle predisponují k rakovině, přispívají k mutantnímu fenotypu mnoha malignit a mohou umožnit přežití a proliferaci nádorových buněk i přes zvýšenou míru mutací a nestabilitu genomu. Také aberantní buněčná proliferace způsobená aktivací onkogenu nebo inaktivací určitých nádorových supresorů vyvolává replikační stres DNA, který ústí v poškození DNA (Jackson *et Bártek*, 2009). Zejména abnormality a nedostatky v expresi velkého počtu faktorů podílejících se na opravě DNA, jako jsou proteiny BRCA1 (BREast CAncer type 1 susceptibility protein) a BRCA2 (BREast CAncer type 2 susceptibility protein), nebo rozhodující regulátory buněčného cyklu, jako je 53BP1 (p53-Binding Protein 1; tumor suppressor p53-Binding Protein 1), nejenže korelují s karcinogenezí, ale odrážejí také

narušenou a nevyváženou síť stávajících mechanismů oprav DNA (Vlachostergios *et al.*, 2009).

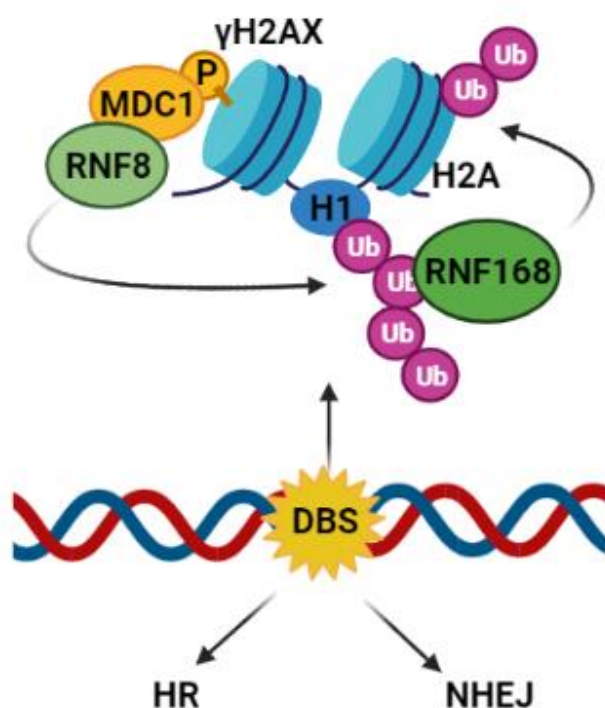
3.3.1 ATM-Chk2 a ATR-Chk1

Aby bylo během buněčného dělení zajištěno předání přesné kopie genomu dceřiným buňkám, byla vyvinuta v základním mechanismu buněčného cyklu řada kontrolních bodů. Celkovou funkcí kontrolních bodů buněčného cyklu je detekovat poškozenou nebo abnormálně strukturovanou DNA, a koordinovat postup buněčného cyklu s opravou DNA. Aktivace kontrolního bodu typicky zpomaluje nebo zastavuje progresi buněčného cyklu, čímž poskytuje čas vhodným opravným mechanismům k opravě genetických lézí před jejich předáním další generaci dceřiných buněk (Abraham, 2001; Zhang *et al.*, 2012). Zásadní roli v časném přenosu signálu prostřednictvím kontrolních bodů buněčného cyklu hrají kinázy ATM (Ataxia-Telangiectasia-Mutated) a ATR (Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related) (Abraham, 2001; Awasthi *et al.*, 2015). V ATM a ATR je přítomno několik S/TQ motivů, prostřednictvím kterých se mohou tyto kinázy autofosforylovat, čímž dochází k přechodu kináz z neaktivních dimerů na aktivní monomery. Každá kináza navíc vyžaduje specifický proteinový kofaktor pro stabilní translokaci do místa poškození DNA (Blackford *et al.*, 2017). Následně ATR a ATM inicují rozsáhlé buněčné reakce prostřednictvím fosforylací efektorových proteinů (Turgeon *et al.*, 2018). Doposud nejlépe charakterizovaným efektozem ATR je Chk1 (Checkpoint Kinase 1), která je aktivována ATR-zprostředkovanou fosforylací po vytvoření jednovláknového zlomu v DNA (SSB, Single-Strand Breaks). Efektozem signalizace ATM je Chk2 (Checkpoint kinase 2), kterou aktivuje ATM-zprostředkovaná fosforylace po vytvoření dvouvláknového zlomu (DSB, Double-Strand Breaks) (Awashi *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2015).

3.3.2 Role UPS při DDR

Z mnoha typů lézí DNA jsou nejvíce cytotoxické právě dvouřetězcové zlomy DNA (DSB). V reakci na ně je spuštěna buněčná odpověď projevující se akumulací mnoha signálních a opravných faktorů chromatinu, které obklopují zlom DNA. Takovou buněčnou odpověď lze cytologicky sledovat, jelikož se akumulace opravných faktorů projevuje tvorbou specifických subnukleárních struktur, tzv. fokusů (Lukáš *et al.*, 2004). Shromáždění opravných faktorů v místech zlomu je hierarchický proces, který je do značné míry závislý na ubikvitinaci proteinů (Panier *et al.*, 2009; Al-Hakim *et al.*, 2010). Vzhledem k tomu, že se v nádorových buňkách z důvodu replikačního stresu, proteotoxického stresu a dopadu standardní léčby v podobě radio- a chemoterapie vyskytují léze DNA, zejména pak DBS, ve vyšší míře, je reakce buněk na tento typ poškození pro vývoj rakoviny zásadní (Al-Hakim *et al.*, 2010; Chromá *et al.*, 2017). Odpověď savčích buněk na DBS je úzce spjata s ATM a DNA-PK indukovanou

fosforylací a ubikvitinací proteinů (**Obr. 13**) na poškozeném chromatinu zprostředkovanou ubikvitinačními ligázami RNF8 a RNF168 (Lukáš *et al.*, 2011). RNF8 se k místům poškození DNA dostává prostřednictvím vazby na fosforylovaný MDC1 (Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1), adaptační protein rozpoznávající počáteční signál DSB v podobě ATM-fosforylované histonové varianty H2AX (γ H2AX) (Reinhardt *et Yaffe*, 2013). V návaznosti na to označí RNF8 K63-polyubikvitinovanými řetězci histon H1, což podporuje navázání další klíčové ligázy RNF168, která následně ubikvitinuje histony H2A a H2AX (Thorslund, 2015; Chromá *et al.*, 2017; Torrecilla *et al.*, 2017). Ubikvitinace histonových podjednotek (H2A, H2AX a H2B) je počáteční událostí podporující destabilizaci nukleozomu (Brinkmann *et al.*, 2015) a iniciuje rekrutování opravných proteinů do míst poškození (Meerang *et al.*, 2011).



Obr. 13: Počáteční signalizace v místě poškození DNA. K ubikvitinaci histonů v reakci na vznik dvouřetězcového zlomu je nezbytná koordinovaná spolupráce ubikvitin-ligačních enzymů RNF8 a RNF168. RNF8 je do míst DSB rekrutován prostřednictvím interakce s MDC1, což podporuje polyubikvitinaci histonu H1. To slouží jako náborový signál pro RNF168, který katalyzuje a šíří ubikvitinaci na histon H2A. Takové ubikvitinové značení dává poté signál proteinům DDR k rekrutování do místa poškození. Vytvořeno v Biorender.com dle Nakada, 2016.

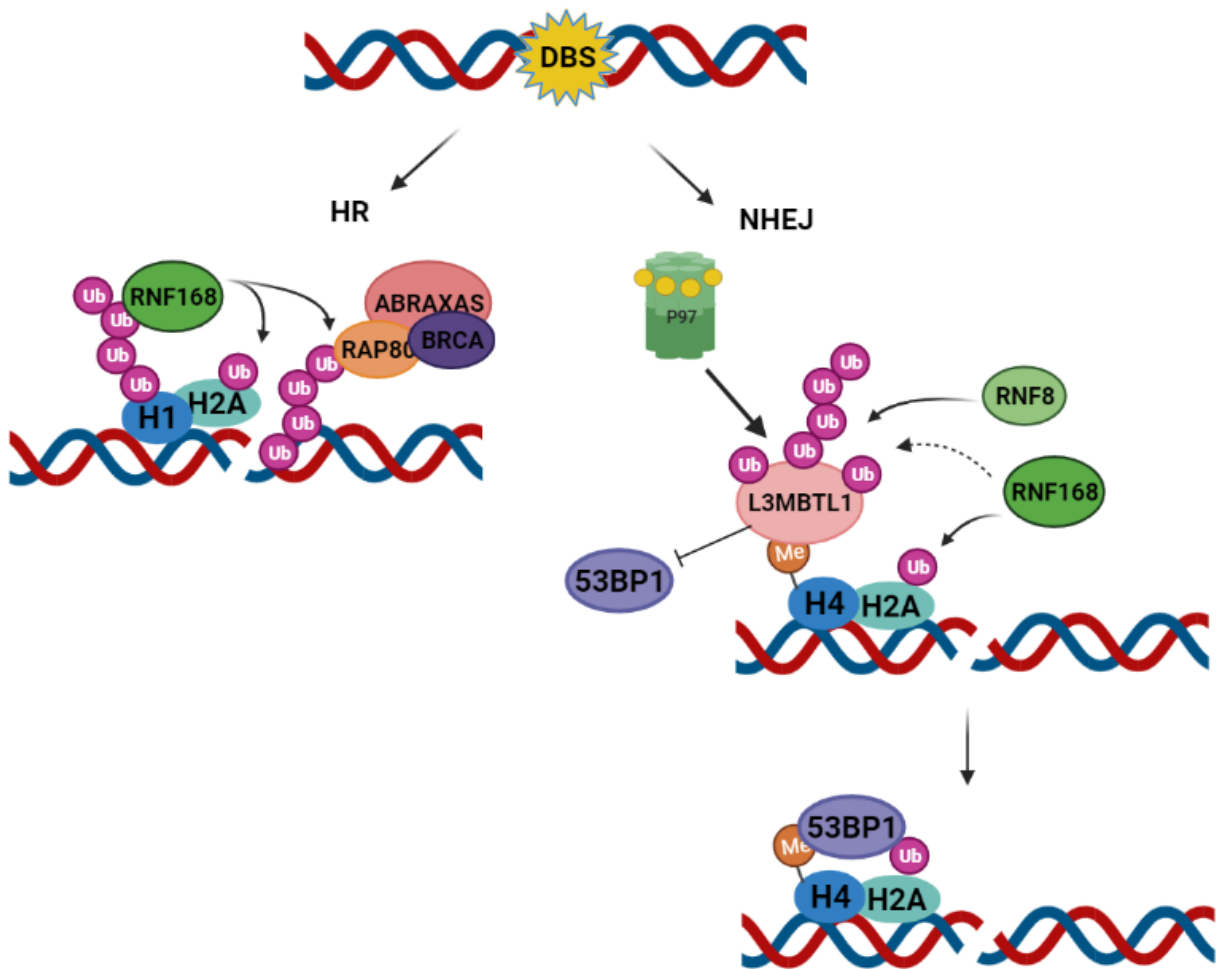
Která ze dvou cest oprav DSB je zvolena, je v zásadě určeno tím, zda se na poškozenou oblast váží proteiny Ku (Ku70 a Ku80) nebo RAD52. Dráha NHEJ je iniciována, pokud s poškozeným místem interagují proteiny Ku. Pakliže se před Ku váže na poškozenou DNA RAD52, je k opravě poškození zahájen mechanismus HR (Bassing *et Alt*, 2004). Aktivita

RAD52, vazebného partnera rekombinázy RAD51, je vyvažována ubikvitin selektivní segregázou P97, která brání nadbytečné rekombinaci a tím nestabilitě genomu (Bergink *et al.*, 2013). Heterodimer Ku70/80 tvoří pevně vázaný kruh, který je po ligaci DSB stéricky zachycen na DNA (Walker *et al.*, 2001). K jeho otevření a uvolnění z DNA jsou potřebné konformační změny. Uvolňování Ku z DNA je vyvoláno modifikací Ku80 K48-polyubikvitinovými řetězci generovanými RNF8 (Postow *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2012; Ismail *et al.*, 2015). Samotná extrakce je zprostředkována P97, a vyžaduje účast hlavních adaptorových proteinů UFD1 a NPL4. Odstranění Ku70/80 z DSB umožňuje koncovou resekci DNA – primární událost HR, a následné rekrutování RAD51 a aktivace HR. Deplece adaptorů UFD1-NPL4 snižuje rychlost extrakce Ku80. Vyčerpání samotného NPL4 ovlivňuje odstranění Ku80 v menší míře, což naznačuje, že NPL4 je pro proces méně kritický než UFD1 (van den Boom *et al.*, 2016).

Aby byla zajištěna vyvážená oprava DSB, musí být hladiny ubikvitinačních ligáz přísně regulovány. Tato homeostáza je koordinována P97 v komplexu s DUB Ataxinem 3 (ATX3), který působí dvěma možnými mechanismy regulace. Za fyziologických podmínek vytváří P97-ATX3 funkční komplex s RNF8 nezbytný pro udržení fyziologické úrovně exprese této ubikvitin ligázy, která je neustále auto-K48-polyubikvitinována, což signalizuje proteazomální degradaci závislou na P97. ATX3 působí proti této dráze a odstraňuje K48-polyubikvitinované řetězce, čímž zpomaluje rychlost degradace RNF8. Druhý mechanismus je využíván za genotoxických podmínek a projevuje se synergickým působením P97-ATX3 k přímé extrakci RNF8 z chromatinu, čímž zabraňuje zvýšené akumulaci této ubikvitin ligázy v místech lézí DNA. Těmito možnými cestami inhibuje interakce P97-ATX3 s RNF8 resekci konců a dráhu HR, specificky ovlivňuje shlukování RNF168 a 53BP1 a tím podporuje opravnou dráhu NHEJ (Singh *et al.*, 2019).

Další proteiny kritické pro opravu DNA a genomovou integritu jsou 53BP1 (p53 vázající protein 1) a BRCA1. Akumulace 53BP1 dominuje v G1-fázi buněčného cyklu a podporuje aktivaci NHEJ, zatímco akumulace BRCA1 dominuje v S-fázi a G2-fázi, kdy jsou k dispozici sesterské chromatidy a je využíváno HR (Yun *et al.*, 2009; Jackson *et al.*, 2013; Brinkmann *et al.*, 2015). Přestože BRCA1 neobsahuje vazebné motivy pro ubikvitin, hromadí se na místech DSB prostřednictvím interakce s proteiny Abraxas (CCDC98) a RAP80 (adaptační protein 80). RAP80 obsahuje tandemové interagující motivy ubikvitinu, které rozpoznávají K63-polyubikvitinované řetězce generované RNF168 v místech DSB (Sobhian *et al.*, 2007; Al-Hakim, 2010). Stejně jako BRCA1, také 53BP1 neobsahuje žádné motivy vázající ubikvitin. Neinteraguje však ani s proteiny, o nichž je známo, že se specificky vážou na ubikvitin v místech DSB, a i přesto ke své akumulaci v místech poškození DNA spoléhá na RNF8/RNF168 (Al-Hakim, 2010). RNF8 a RNF168 totiž podporují P97 zprostředkované extrahování polycombového proteinu L3MBTL1 z DNA v oblasti DSB, které demaskuje vazebná místa pro 53BP1 (**Obr. 14**)

(Acs *et al.*, 2011).



Obr. 14: Rekrutování 53BP1 a BRCA do míst poškození DNA. Ubikvitinační signály poskytují platformy pro rekrutování řady důležitých komponent opravných drah DSB, včetně 53BP1 a BRCA1, které mají klíčové role v podpoře efektivity a věrnosti oprav DSB a výběru opravné dráhy. BRCA je rekrutována přes proteiny RAP80 a Abraxas, 53BP1 díky extrakci polycombového proteinu L3MBTL1. Vytvořeno v Biorender.com dle Nakada, 2016 a Smeenk *et Mailand*, 2016.

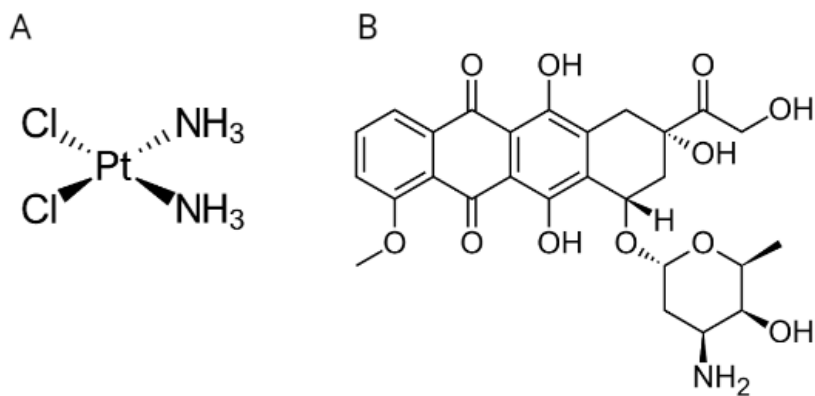
3.3.3 Léčba rakoviny látkami indukujícími poškození DNA a jejich kombinace s proteazomovými inhibitory

Jelikož jsou metody imunoterapie a cílené terapie stále v ranných stádiích výzkumu, je jejich využití v praxi spíše výjimečné. Taktéž je nutno podotknout, že s jejich využíváním jsou spojeny vysoké náklady. Hlavním cílem léčby proto stále zůstává eliminace nádorových buněk chirurgickým odstraněním nebo jejich usmrcením pomocí radioterapie nebo chemoterapie

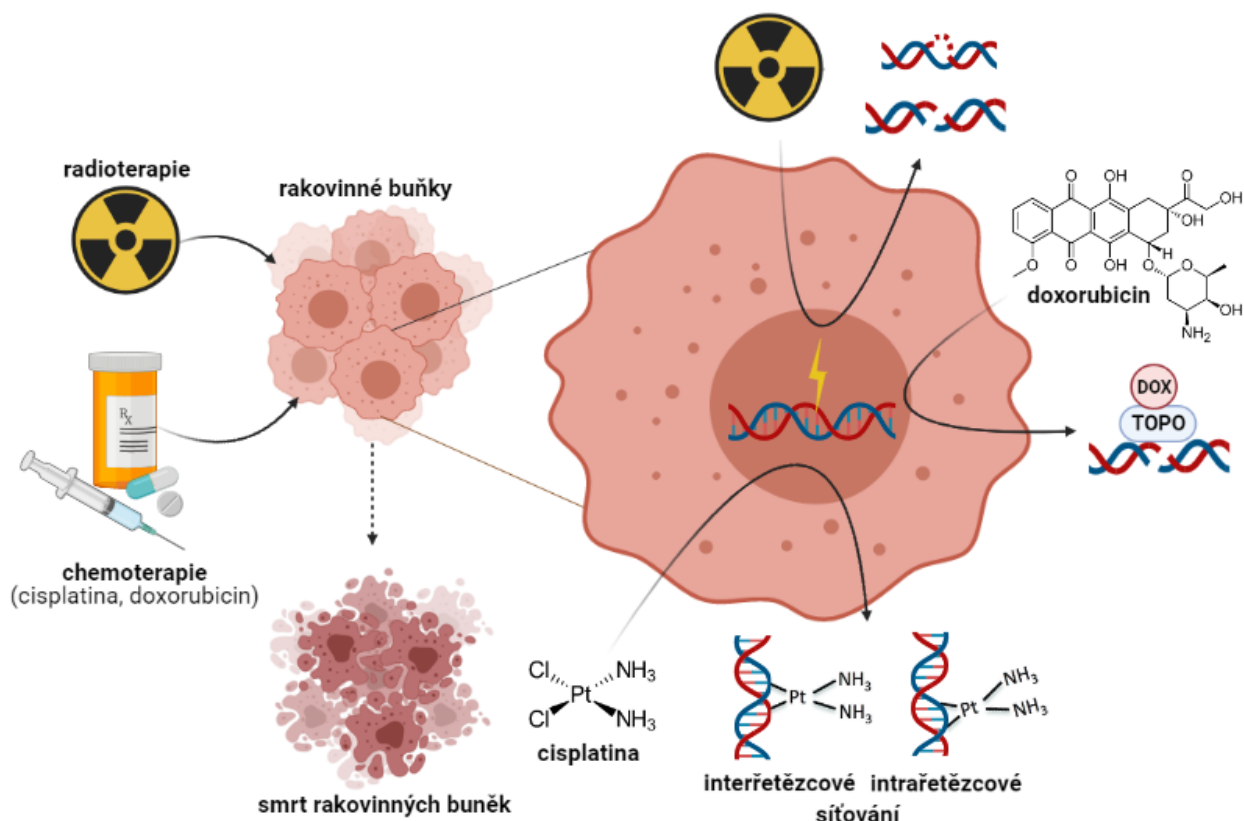
(Kiwerska *et Szyfter*, 2019). V klinickém prostředí protinádorových strategií mají tedy terapie způsobující poškození DNA po desetiletí prominentní postavení. Základním úspěchem těchto terapií je skutečnost, že rakovinné buňky reagují na poškození DNA koordinovaným způsobem a za vhodných farmakologických podmínek mohou vyvolat různé reakce (Reuvers *et al.*, 2020). Pokud totiž poškozenou DNA nelze řádně opravit, může dojít k buněčné smrti. Rakovinové buňky mají obvykle pozměněné schopnosti detekovat/opravit poškození DNA, a co je důležitější, jsou schopné ignorovat kontrolní body buněčného cyklu, což umožňuje buňkám dosáhnout vysoké míry proliferace. Díky tomu jsou také náchylnější k poškození DNA, protože replikace poškozené DNA zvyšuje pravděpodobnost buněčné smrti (Cheung-Ong *et al.*, 2013). Ačkoli terapie indukují poškození DNA jak ve zdravých, tak v rakovinných buňkách, rakovinné buňky jsou cíleny přednostně kvůli specifickým změnám v jejich DDR drahách, které vedou v nestabilitu genomu (Yao *et Dai*, 2014; Pilié *et al.*, 2019; Reuvers *et al.*, 2020). Zejména buňky nacházející se v S-fázi buněčného cyklu jsou na poškození DNA mnohem citlivější (Willis *et Rhind*, 2009). Pole terapií způsobujících poškození DNA zaznamenalo v posledních desetiletích obrovský rozvoj a zlepšení dopadu léčby. Od objevu protinádorových vlastností radioterapie a chemoterapie bylo získáno velké množství znalostí o jejich mechanismu působení a klinických účincích u různých skupin pacientů (De Vita *et Chu*, 2008; Gianfaldoni *et al.*, 2017; Reuvers *et al.*, 2020).

Záření používané v radiační terapii se nazývá záření ionizující (IR), protože vytváří ionty (elektricky nabitě částice) a ukládá energii v buňkách tkání, kterými prochází. Tato uložená energie může rakovinné buňky zabít nebo způsobit genetické změny vedoucí k jejich smrti. Vysokoenergetické záření poškozuje genetický materiál buněk (**Obr. 16**), čímž blokuje jejich schopnost se dále dělit a množit. Ačkoli záření poškozuje jak zdravé buňky, tak i ty rakovinné, cílem radiační terapie je maximalizovat dávku záření abnormálním rakovinným buňkám při minimalizaci expozice buňkám zdravým (Baskar *et al.*, 2012). Velkým problémem radioterapie je však vznikající rezistence některých rakovinných buněk na IR záření (Willers *et al.*, 2013). Kromě radioterapie bylo dosaženo velkého pokroku také v chemoterapii. Její princip spočívá v preferenčním cílení na vysoce proliferující buňky chemickými látkami, které přímo způsobují poškození DNA nebo interferují s procesy souvisejícími s DNA, jako je například replikace. Pět hlavních tříd cytotoxických chemoterapeutik zastupují alkylační látky, sloučeniny na bázi platiny, antimetabolity, inhibitory topoizomeráz a protinádorová antibiotika (Cheung-Ong *et al.*, 2013; Reuvers *et al.*, 2020). **Alkylační činidla**, jako je například cyklofosamid, reagují přímo s atomy kyslíku a dusíku DNA bází za vzniku různých aduktů (Drabløs *et al.*, 2004), které zastavují buněčnou proliferaci a aktivují reakci na poškození DNA (Yimit *et al.*, 2019). **Sloučeniny na bázi platiny**, mají podobný mechanismus účinku jako alkylační sloučeniny a jejich objev měl významný pozitivní dopad na výzkum protinádorových léků (Cheung-Ong *et al.*, 2013; Reuvers *et al.*, 2020). Léčivo cisplatina (cis-diamin-dichlor-platina^{II}) obsahuje platinové jádro se dvěma

chloridovými a dvěma aminovými skupinami (**Obr. 15A**). Po vstupu do buňky umožňuje platině akvizice chloridových skupin kovalentně vázat purinové báze za vzniku aduktů na DNA (**Obr. 16**), které způsobují intra- a interřetězcové síťování (Eastman, 1987; Wang *et al.*, 1996; Kelland, 2007). Ačkoli vykazuje cisplatina široké spektrum protinádorové aktivity, je její použitelnost omezená kvůli dvěma faktorům. Prvním faktorem je získaná buněčná rezistence na cisplatinu vedoucí k recidivitě onemocnění a druhým je značná toxicita pro zdravé tkáně (Yimit *et al.*, 2019). **Antimetabolity**, například metotrexát, představují třídu protinádorových léků, které napodobují normální buněčné molekuly nezbytné pro replikaci a opravu DNA. Mnoho z těchto sloučenin jsou antagonisté DNA, kteří inhibují metabolické cesty nukleotidů (Parker, 2009; Cheung-Ong *et al.*, 2013). **Inhibitory topoizomeráz** se zaměřují na topoizomerázy, enzymy, které řeší topologické problémy spojené s replikací, transkripcí, rekombinací a remodelací chromatinu generováním dočasných jednořetězcových nebo dvouřetězcových zlomů v DNA (Champoux, 2001). Topoizomerázové jedy, jmenovitě například topotecan nebo etoposid, se váží na komplexy topoizomeráza-DNA a zachycují je v DNA, čímž generují zlomy indukující buněčnou smrt (Reuvars *et al.*, 2020). **Antracyklinová antibiotika** fungují rovněž jako jedy topoizomeráz (**Obr. 16**), ale mají další protinádorové mechanismy, včetně schopnosti interkalace do DNA, generování volných radikálů, vázání a alkylace DNA, zesíťování DNA a interference s aktivitou helikázy. Typickým příkladem takového antibiotika je vysoce cytotoxický doxorubicin (**Obr. 15B**), odvozen od *Streptomyces peucetius* (Minoti *et al.*, 2004; Cutts *et al.*, 2005; Cheung-Ong *et al.*, 2013).



Obr. 15: Chemická struktura cisplatiny a doxorubicinu. (A) Cisplatina. (B). Doxorubicin.



Obr. 16: Typy poškození generované vybranými chemoterapeutiky a IR zářením.

IR záření způsobuje v DNA poškození zejména ve formě dvouvláknových zlomů, cisplatina indukuje inter- a intra-řetězcové síťování a doxorubicin blokuje funkci topoizomerázy. Vytvořeno v Biorender.com.

Vývoj rezistence na léčbu, je jedním z hlavních omezení úspěšných režimů chemoterapie. Chemorezistence, projevující se zejména u léčiv na bázi platiny, ale také například u doxorubicinu, byla dříve spojována se selháním léčiva při indukci apoptózy, což je nejčastější odpověď buněk na chemoterapeutika (Rabik *et Dolan*, 2007; Yu *et Wang*, 2012; Cox *et Weinman*, 2016). Chemorezistence disponuje velmi heterogenní povahou a veškeré mechanismy nebyly zatím zcela objasněny. Mezi známé mechanismy vzniku chemorezistence se řadí nadměrný odtok léčiva z buňky, inaktivace léčiva antioxidanty nebo zvýšené úrovně oprav DNA (Rabik *et Dolan*, 2007; Cox *et Weinman*, 2016; Ji *et al.*, 2019). Pokročilý výzkum ubikvitin-proteazomového systému prokázal, že svou roli v růstu a přežití nádorů hraje také dysregulace degradace proteinů (Dou *et Zonder*, 2014), a že po působení proteazomových inhibitorů vykazují buňky větší citlivost na látky poškozující DNA. Cílení UPS v kombinaci s chemoterapeutiky je tedy jedním z možných přístupů pro překonání chemorezistence (Yunmbam *et al.*, 2001; Mitsiades *et al.*, 2003).

Inhibitory proteazomu narušují fosforylaci, ubikvitinaci a degradaci I κ B α , čímž dochází

k inhibici dráhy NF- κ B (Hideshima *et al.*, 2002; Perkins *et al.*, 2012). Alternativním účinkem inhibice proteazomu je indukce apoptózy (Russo *et al.*, 2007; Cron *et al.*, 2013). Apoptóza je v lidských buňkách zprostředkovávána apoptickými dráhami závislými na aktivaci kaspáz. Bortezomib se v kombinované léčbě s cisplatinou projevuje právě výraznou aktivací kaspáz, čímž je v buňkách schopen opět navodit apoptózu (Konac *et al.*, 2015). Přestože je aktivace kaspáz v mechanismu apoptózy klíčová, primárními regulátory aktivace kaspáz jsou proteiny rodiny Bcl-2 (Elkholi *et al.*, 2011). Je známo, že nadexprese Bcl-2 blokuje apoptózu, a tak je tento protein významným cílem v prevenci rezistence na léčbu cisplatinou (Cho *et al.*, 2006). Hladiny exprese pro-apoptotických a anti-apoptotických proteinů rodiny Bcl-2 jsou přímo regulovány inhibicí proteazomu (Fennell *et al.*, 2008). Kombinovaná léčba Bortezomibu s cisplatinou vede ke zvýšeným hladinám exprese dvou pro-apoptotických proteinů Bik a Bim, které tedy zprostředkovávají synergický účinek těchto léčiv indukci apoptózy (Elkholi *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2014; Konac *et al.*, 2015). Stejně jako cisplatin se také doxorubicin projevuje synergickým účinkem v kombinaci s Bortezomibem (Horton *et al.*, 2006).

Jedním ze zásadních efektů inhibice proteazomu je rovněž deplece volného ubikvitinu v jádře. Vlivem proteotoxického stresu vyvolaného proteazomovými inhibitory, je ubikvitin v buňce redistribuován, až dojde k jeho zachycení v cytoplazmatických proteinových konjugátech kvůli omezené recyklační kapacitě proteazomu. V důsledku toho je hladina volného ubikvitinu v jádře vyčerpána a jaderné procesy závislé na ubikvitinu, jako je signalizace DSB, jsou oslabeny. Typickým fenotypovým projevem útlumu DDR za podmínek deplece ubikvitinu je neschopnost rekrutovat proteiny 53BP1 a BRCA1 do míst poškození (Dantuma *et al.*, 2006; Jacquemont *et al.*, 2007; Chromá *et al.*, 2017). Širšímu použití inhibitorů proteazomu v léčbě rakoviny nicméně stále brání omezená účinnost proteazomové inhibice *in vivo* a častý výskyt rezistence na tyto inhibitory zejména v solidních nádorech (Deshaies, 2014).

3.3.4 Další experimentální přístupy v léčbě rakoviny

Pro vývoj malých molekul, sloužících ke zvýšení citlivosti na radioterapii a chemoterapii, byly rozsáhle zkoumány také hlavní kinázy DDR (Zhang *et al.*, 2012). Inhibice těchto kináz se stala atraktivní terapeutickou koncepcí v léčbě rakoviny hned ze dvou důvodů. Zaprvé, protože je rezistence vůči genotoxickým terapiím spojena se zvýšenou signalizací DDR, a zadruhé, protože má mnoho rakovin defekty v určitých složkách DDR a cesta k přežití buněk je tak závislá na zbývajících složkách DDR. Defekty v jednotlivých komponentách DDR mohou poskytnout rakovinným buňkám růstovou výhodu, která jim umožňuje přežít a množit se navzdory genomové nestabilitě a vyvolanému replikačnímu stresu. Mohou také řídit závislost rakovinných buněk na všech zbývajících funkčních drahách DDR tak, aby buňky poškození DNA přežily. Pro rakovinné buňky může být cílení na tyto zbývající dráhy a na buňky s mutacemi v určitých genech DDR

selektivně toxické (Weber *et al.*, 2015). V centru pozornosti současných výzkumných aktivit tak zůstávají díky rolím při opravách DNA, regulaci buněčného cyklu a apoptóze, ústřední kinázy ATM a ATR (Awasthi *et al.*, 2016), které představují v raných fázích tumorigeneze bariéru pro progresi nádoru indukci zástavy buněčného cyklu a apoptózy (Bártek *et al.*, 2007; Bártek *et al.*, 2007).

Mnoho z genotoxických látek, které se v současné době při léčbě rakoviny používají, jsou ve skutečnosti silnými induktory replikačního stresu (RS) a aktivace kontrolních bodů buněčného cyklu v rakovinných buňkách ošetřených těmito látkami vyvolává v mnoha případech spíše zastavení buněčného cyklu než buněčnou smrt. Přínosným se stal vývoj specifických inhibitorů ATR, jejichž klíčovou výhodou je skutečnost, že kromě generování RS deaktivují také kontrolní body buněčného cyklu, a nakonec vedou k mitotické katastrofě a buněčné smrti (Lecona *et al.*, 2018). ATR inhibitory produkují RS tím, že spouští rozsáhlou aktivaci počátků replikace, která generuje nadbytek ssDNA k vyčerpání dostupných buněčných zásob RPA (Toledo *et al.*, 2013). Vyčerpány jsou navíc také buněčné zásoby dNTP, takže DNA polymerázy čelí nedostatku substrátu k dokončení replikace DNA (Zhang *et al.*, 2009; Buisson *et al.*, 2015). Mimo to navyšují ATR inhibitory hladinu RS a genomové nestability tím, že podporují rozbití zastavených replikačních vidlic (Tercero *et al.*, 2001) a/nebo inhibují jejich opravu (Buisson *et al.*, 2017). Tím na rozdíl od genotoxických látek, které fungují výlučně blokováním postupu replikačních vidlic, generují RS několika nezávislými způsoby. Dalším důsledkem inaktivace ATR je předčasný vstup buněk do fáze mitózy, který ústí v masivní fragmentaci mitotických chromozomů a buněčnou smrt (Eykelboom *et al.*, 2013; Lecona *et al.*, 2018). Vývoj specifických a silných inhibitorů ATR byl náročný, a to z důvodu značné velikosti proteinu ATR, a také kvůli omezení jeho aktivity na S- a G2- fáze buněčného cyklu (Lecona *et al.*, 2018). V poslední době se však podařilo vyvinout vysoce účinné, selektivní a *in vivo* aktivní inhibitory ATR (Foote *et al.*, 2015). Zástupcem nové rodiny inhibitorů ATR je sloučenina AZ20 (Foote *et al.*, 2013), která byla dále optimalizována pro generování jejího derivátu AZD6738 (Vendetti *et al.*, 2015; Lecona *et al.*, 2018). AZD6738 je účinný selektivní inhibitor, který je v současné době sledován v několika klinických studiích jako monoterapie, ale i v kombinaci s karboplatinou (NCT02264678), radioterapií (NCT02223923) nebo novými cílenými látkami, např. Olaparibem (NCT03462342, NCT03330847) (Foote *et al.*, 2018).

Nezaostává ani klinický vývoj inhibitorů ATM. Ty sice v preklinických výzkumech jako monoterapie nevykazovaly velké protirakovinné účinky, v kombinaci s cytotoxickými chemoterapeutiky nebo radioterapií ale napomáhají ke zvýšení poškození DNA. Pro klinické studie solidních nádorů byly vybrány tři inhibitory ATM a to AZD0156 (NCT02588105), KU-60019 (NCT03571438) a AZD1390 (NCT03423628) (Jin *et al.*, 2019).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro experimenty byla použita adherentní buněčná linie U-2 OS, lidská buněčná linie odvozená z osteosarkomu, a H1299, lidská nemalobuněčná linie plicního karcinomu odvozená z lymfatických uzlin. Buňky byly získány od společnosti ATCC (American Tissue Culture Collection). Pro některé experimenty byly zkonstruovány buněčné linie U-2 OS stabilně exprimující Ub-GFP, P97-GFP a NPL4-GFP, buněčné linie H1299 stabilně exprimující P97-GFP a mutantní buněčné linie U-2 OS-NPL4-GFP (viz Škrott *et al.*, 2017).

4.2 Použité soupravy a chemikálie

Použité chemikálie

- 5-Brom-2'-deoxyuridin; BrdU (kat. č.: B9285; Sigma Aldrich, USA)
- 8-methoxypsoralen (kat. č.: M3501; Sigma Aldrich, USA)
- AZD6738 (kat. č.: S7693; Selleckchem, USA)
- CB-5083 (kat. č.: S8101; Selleckchem, USA)
- Cisplatina Hospira (Pfizer)
- CuET, bis-(diethyldithiokarbamát)-měďnatý komplex (kat. č.: SML2675; Sigma Aldrich, USA)
- DAPI (kat. č.: D9542; Sigma Aldrich, USA)
- Dimethyl sulfoxid (kat. č.: D8418, Sigma-Aldrich, USA)
- DMEM high glucose liquid with Sodium Pyruvate with L-Glutamine (kat. č.: E15-843; PAA, The Cell Culture Company; USA)
- Doxocyklin (kat. č.: D9891; Sigma Aldrich, USA)
- Doxorubicin (kat. č.: D2975000; Sigma Aldrich, USA)
- Ethanol 70% (kat. č.: 70392-11001; Penta, Česká republika)
- Formaldehyd 4% (kat. č.: 100496; Sigma Aldrich, USA)
- Geneticin (G418) (kat. č.: A1720; Sigma Aldrich, USA)
- Hoechst33258 (kat. č.: B2883; Sigma Aldrich, USA)
- Hovězí sérový albumin (FBS; Fetal Bovine Serum), tepelně inaktivovaný, sterilní, vhodný pro buněčné linie (kat. č.: F9665, Sigma-Aldrich, USA)
- Marker relativních molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Dual Colour Standards (kat. č.: 1610374; Bio-Rad, USA)
- MLN7243 (kat. č.: S8341; Selleckchem, USA)
- Montovací médium (kat. č.: S302380-2; Agilent Technologies, USA)
- pCMV6-VCP-GFP (kat. č.: PS100010; Origene, USA)

- Použité primární protilátky:
 - mouse monoclonal anti- β -actin, 1:300 (kat. č.: SC-47778; Santa Cruz Biotechnology, USA)
 - mouse monoclonal anti- γ H2AX, 1:500 (kat. č.: 05-636; Merck Millipore, USA)
 - rabbit monoclonal anti-VCP, 1:1000 (kat. č.: NB100-1557; Novus Biologicals, USA)
- Použité sekundární protilátky:
 - Alexa Fluor 568 goat anti-mouse, 1:1000 (kat. č.: A11004; Invitrogen)
 - donkey anti-rabbit IgG-HRP, 1:1000 (kat. č.: NA934; GE Healthcare, USA)
 - goat anti-mouse IgG-HRP, 1:1000 (kat. č.: NA931; GE Healthcare, USA)
- Penicilin/Streptomycin 100x (kat. č.: P11-010; PAA, The Cell Culture Company)
- Trypsin (kat. č.: 59427C; Sigma Aldrich, USA)
- Velcade® (Janssen-Cilag International N,V.; Belgie)
- Vodný roztok křemičitanu sodného (kat. č.: 338443; Sigma Aldrich, USA)

Příprava roztoků

- Blokovací roztok
 - sušené mléko v 1×TBS (2,5 g do 50 ml)
- Fosfátový pufr 1× (PBS; Phosphate Buffer Saline)
 - 135 mM NaCl; 1,3 mM KCl; 3,2 mM Na₂HPO₄·12 H₂O; 0,5 mM KH₂PO₄; dH₂O; pH 7,4
- Gel separační
 - dH₂O; 30% akrylamid mix; 1,5 mM Tris (pH 8,8); 10% SDS, 10% APS; TEMED
- Gel zaostřovací
 - dH₂O; 30% akrylamid mix; 0,5 mM Tris (pH 6,8); 10% SDS, 10% APS; TEMED
- Permeabilizační roztok 0,5% Tritonu X
 - 10% Triton X v dH₂O
- Roztok krystalové violeti
 - krystalová violet; 96% methanol; dH₂O
- SDS nanášecí pufr
 - 250 mM Tris-HCl; 10% SDS; 30% glycerol; 0,5 M DTT; 0,02% bromfenolová modř; pH 6
- TBS (Tris Buffer Saline) pufr 1×
 - 0,05 M Tris; 0,15 M NaCl; dH₂O; pH 7,65
- Tris-glycin SDS transferový (TGS) pufr 1×
 - 25 mM Tris; 192 mM glycin; 0,1% SDS; dH₂O; pH 8,3

Použité soupravy

- Viromer® RED kit (kat. č.: TT100302; Origene, USA)
- SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (kat. č.: 34577; Thermo Fisher Scientific, USA)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Analyzátor buněčné viability Vi-Cell XR (Beckman Coulter, USA)
- Aparatura pro elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad, USA)
- Aparatura pro transferový přenos Trans-Blot® SD Semi-Dry Cell (Bio-Rad, USA)
- CX3 cabinet X-RAY irradiator (XStrahl Limited, Velká Británie)
- Detekční systém pro kvantifikaci exprese proteinů ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, USA)
- Digestoř odtahovaná Merci G NextGen (MERCIS s.r.o., ČR)
- Inkubátor s příslušenstvím HERACELL 150i (Thermo Scientific, USA)
- Laboratorní váhy SBC 21 (Scaltec, USA)
- Laminární box (Thermo Scientific, USA)
- Mikroskop invertovaný IX51 (Olympus, Česká republika)
- Mikroskop Zeiss AxioImager Z.1 v kombinaci s LSM 780 konfokálním modulem (Zeiss, Německo)
- Termoblok ThermoMixer Comfort (Eppendorf, Německo)
- Zdroj stejnosměrného napětí PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Kultivace buněk

Buňky byly kultivovány v DMEM médiu doplněném 10% fetálním bovinním sérem (FBS) a 1% antibiotiky penicilin a streptomycin, a byly udržovány ve vlhkém prostředí inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂. Dvakrát týdně byly buňky pasážovány v laminárním boxu za sterilních podmínek. Během pasážování bylo médium z kultivační nádoby odsáto, buňky byly propláchnuty 1×PBS a poté byl do kultivační lahve přidán trypsin. Buňky s trypsinem byly uloženy do inkubátoru, aby došlo k jejich uvolnění ze dna kultivační lahve. Po jejich uvolnění bylo k buňkám přidáno nové médium a po řádném propipetování byla nechána v lahvi pouze násada buněk tak, aby bylo množství buněk zredukováno na desetinu až pětinu. K násadě bylo doplněno čisté médium a buňky byly vloženy zpět do inkubátoru.

4.4.2 Transfekce buněčné linie

Buňky linie U-2 OS a H1299 byly transfekovány pCMV6-VCP-GFP vektorem (Origene) pomocí kitu Viromer® RED dle pokynů výrobce. Buňky byly podrobeny antibiotické selekci v šesti-jamkové kultivační desce (500 000 buněk na jamku) pomocí geneticinu (G418, 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v poměru 1:500. Médium s geneticinem bylo obnovováno každé 3-4 dny, dokud nebyla plně stanovena populace rezistentních buněk.

4.4.3 Příprava buněčných lyzátů

Z šesti-jamkové kultivační desky bylo odsáto médium a transfekované buňky byly propláchnuty 1×PBS. Po propláchnutí byl k buňkám přidán SDS nanášecí pufr (150 μl na 500 000 buněk). Vizkózní obsah byl z jednotlivých jamek přenesen do mikrozkrumavek, které byly následně v termobloku 5–10 minut zahřáty na 95 °C a několikrát krátce zvortexovány, dokud jejich obsah nepřestal být vizkózní. Takto připravené lyzáty byly použity pro SDS-PAGE.

4.4.4 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v denaturačních podmínkách (SDS-PAGE)

Byla sestavena aparatura pro nalití gelu pro SDS-PAGE elektroforézu. Separace byla provedena v 6% polyakrylamidovém separačním gelu a 4% polyakrylamidovém zaostřovacím gelu. Separační gel byl nalit mezi 1,0 mm skla do výšky $\frac{3}{4}$ skla a byl přelit tenkou vrstvou isopropanolu. Gel byl ponechán 30 minut polymerizovat. Po ztuhnutí gelu byl isopropanol vypláchnut vodou. Separační gel byl převrstven gelem zaostřovacím a mezi skla byl do zaostřovacího gelu umístěn hřebínek. Gel byl ponechán polymerizovat po dobu 30 minut. Po ukončení polymerizace zaostřovacího gelu byla sestavena aparatura pro vertikální SDS-PAGE. Elektroforetická vana byla naplněna 1×TGS pufrem, hřebínek byl vytažen. Vzorky byly před samotným napipetováním 5 minut povařeny při 95 °C a posléze byl do gelu nanesen také marker relativních molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Dual Colour Standards. Po uzavření aparatury byla spuštěna vlastní elektroforetická separace, která probíhala při 70 v přibližně 15 minut a poté při 110 v přibližně 1 hodinu. Po separaci byla aparatura rozebrána a gel byl použit pro Western blotting.

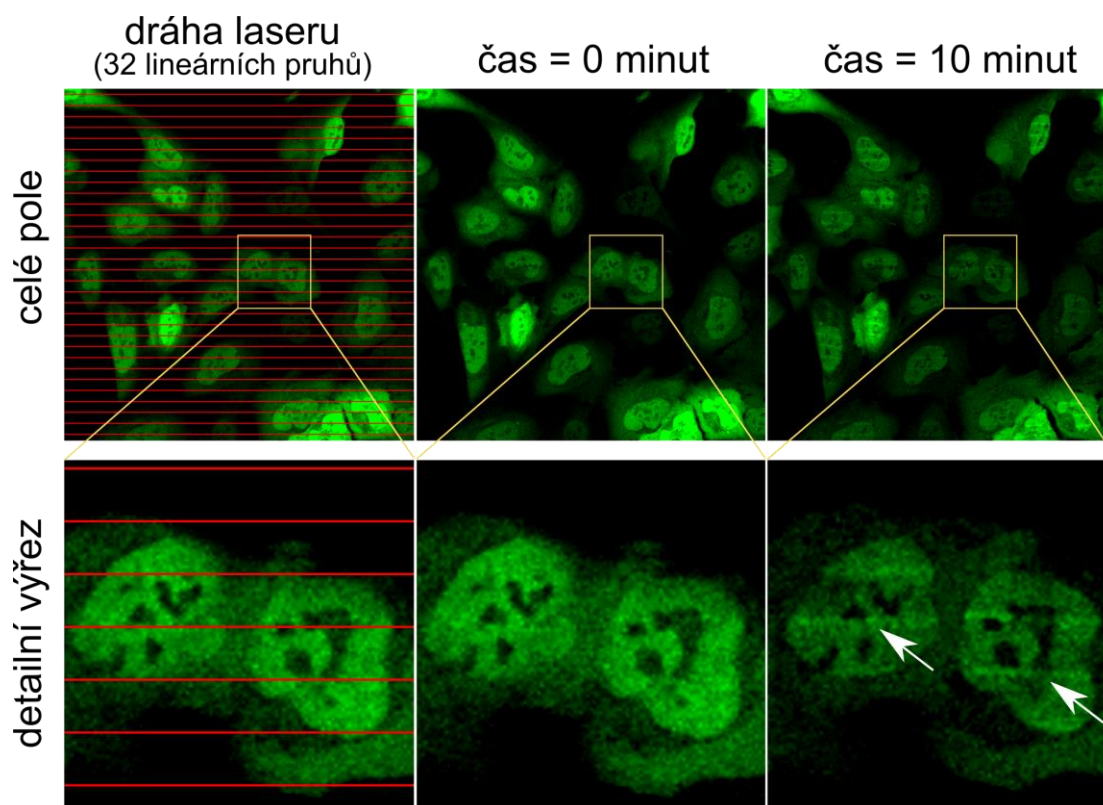
4.4.5 Western blotting

Na jeden gel bylo připraveno 6 kusů filtračního papíru a 1 nitrocelulózová membrána. Filtrační papíry byly namočené do transferového pufru, nitrocelulózová membrána byla nejprve namočena v destilované vodě, posléze také v transferovém pufru. Povrch blotovací kazety byl navlhčen transferovým pufrem a postupně na ni byly skládány komponenty po přenos. Na plochu blotovací kazety byly položeny 3 filtrační papíry, nitrocelulózová membrána, gel z SDS-PAGE a nakonec opět 3 filtrační papíry. Po navrstvení byly komponenty uhlazeny válečkem, aby byly vytlačeny případné bubliny a zamezilo se nekvalitnímu přenosu. Blotovací kazeta byla uzavřena a transferová aparatura byla spuštěna. Přenos proteinů na membránu probíhal 45 minut při konstantním elektrickém napětí 13 V. Po 45 minutách transferu byla kazeta vyjmuta z přístroje

a otevřena. Membrána byla po transferu blokována 30–60 minut v blokovacím roztoku (roztoku sušeného mléka v 1×TBS), poté byla propláchnuta roztokem 1×TBS. Po blokování nespecifických proteinů byla membrána vyříznuta v oblasti výskytu zkoumaného proteinu a v oblasti referenčního proteinu β -aktinu. Na vyříznuté části membrány byly aplikovány roztoky sušeného mléka v 1×TBS s primárními protilátkami proti zkoumanému (rabbit monoclonal anti-VCP antibody, ředění 1:1000) a referenčnímu (mouse monoclonal anti- β -aktin antibody, ředění 1:300) proteinu. Vyříznuté proužky membrány byly v roztocích protilátek 1 hodinu inkubovány, po inkubaci byly roztoky odsáty a membrány byly propláchnuty roztokem 1×TBS. Na propláchnuté proužky membrány byly nanášeny roztoky sušeného mléka v 1×TBS s peroxidázou značenými sekundárními protilátkami proti králičí a myší primární protilátce (obě ředění 1:1000) a membrána byla 1 hodinu inkubována. Po inkubaci byla membrána zakapána detekčním činidlem SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate a vložena do detekčního přístroje ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). Následně byla vyfocena a analyzována pomocí Image Lab 6.1.

4.4.6 Laserová mikroiradiace

Jeden den před laserovou mikroiradiací byly buňky U-2 OS stabilně exprimující Ub-GFP, P97-GFP a NPL4-GFP, buňky H1299 stabilně exprimující P97-GFP a mutantní buňky NPL4-GFP vysety na 24-jamkové destičky se skleněným dnem (Cellvis) v hustotě $8 - 10 \times 10^5$ buněk/ml dle typu buněčné linie. V případě mutantních linií NPL4-GFP bylo nutné z důvodu vyvolání genové exprese NPL4 přidat k buňkám doxocyklin v koncentraci $1 \mu\text{g/ml}$. Hodinu před laserovým mikroozářením byly k buňkám přidány chemikálie v příslušném množství a 30 minut před ozařováním byly buňky navíc senzitivovány na vlnovou délku UV-A pomocí $20 \mu\text{M}$ 8-methoxypsoralenu (8-MOP). Po senzitivaci byly buňky umístěny dovnitř inverzního mikroskopu Zeiss Axioimager Z.1 v kombinaci s LSM 780 konfokálním modulem. Laserové mikrozařování bylo prováděno při 37°C přes objektiv X40 s vodní imerzí (Zeiss C-Apo 403 / 1,2WDICIII) za použití 355 nm 65 mW laseru nastaveného na 100% výkon k indukci DNA poškození. Celková dávka laseru byla nastavena na dvacet ozařovacích cyklů. Buňky byly následně v několika časových intervalech snímány nebo u nich byla provedena imunofluorescenční detekce.



Obr. 17: Princip laserové mikroiradiace. Buňky jsou vystaveny laserovému působení. Dráha laseru (červené čáry) čítá v celém zorném poli 32 lineárních pruhů, tzv. stripů. Po laserové mikroiradiaci lze postupem času sledovat vazbu GFP-značených proteinů, zapojených do reakce na poškození DNA, v místech indukovaných stripů. To lze pozorovat na detailním výřezu po 10 minutách od indukce poškození (značeno šipkami).

4.4.7 Imunofluorescence

Buňky byly 5 minut po laserové mikroiradiaci fixovány vychlazeným 4% formaldehydem po dobu 15 minut při pokojové teplotě, promyty 1×PBS a permeabilizovány 0,5% Tritonem X-100 v 1×PBS po dobu 5 minut. Po promytí 1×PBS byly buňky imunozačeny primární protilátkou (mouse monoclonal anti- γ H2A, ředění 1:500) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Poté byly buňky propláchnuty 1×PBS a barveny sekundární protilátkou (goat anti-mouse, ředění 1:1000) konjugovanou s Alexa Fluor 568 po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Buněčná jádra byla vizualizována barvením DAPI po dobu 2 minut při pokojové teplotě. Po působení DAPI byly buňky opláchnuty vodou, osušeny a pozorovány v konfokálním mikroskopu.

4.4.8 Koloniformní assay (CFA; Colony Formation Assay)

Buňky U-2 OS a H1299 byly vysazeny do dvanácti-jamkové kultivační desky v koncentraci 100 buněk/ml. Další den byly k buňkám přidány chemikálie v příslušných koncentracích, případně byly buňky vystaveny rentgenovému záření, a poté kultivovány po dobu

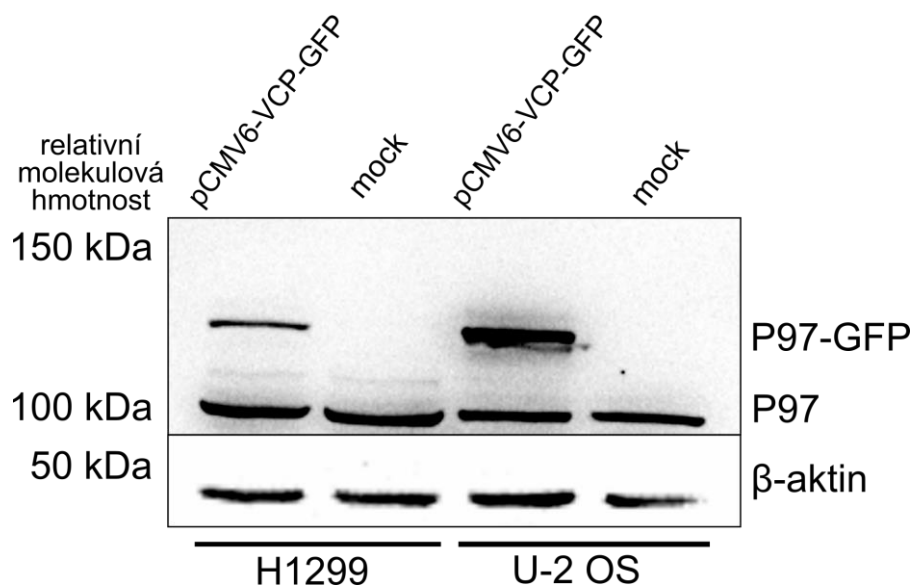
7-10 dnů (dle typu buněčné linie). Po uplynutí doby kultivace bylo médium z jamek odsáto, kolonie byly propláchnuty 1×PBS a fixovány vychlazeným 70% ethanolem po dobu 15 minut. Poté byly kolonie vizualizovány krystalovou violetí, skenovány a spočítány.

5 VÝSLEDKY

5.1 Konstrukce buněčných linií stabilně exprimujících GFP-značené proteiny

Pro některé experimenty bylo nutné zkonstruovat buněčné linie stabilně exprimující GFP-značené proteiny. Transfekcí pCMV6-VCP-GFP byly vytvořeny buněčné linie H1299 a U-2 OS stabilně exprimující P97-GFP a pro ověření úspěšné transfekce byl použit Western blot. Jako referenční protein pro kontrolu nanesení vzorku byl využit β -aktin.

Transfekce pCMV6-VCP-GFP vektorem byla úspěšná v obou buněčných liniích, což potvrzuje výskyt produktu o velikosti mezi 100 a 150 kDa, který odpovídá exogennímu P97 s navázaným GFP fluoroforem. V kontrolních vzorcích parentální buněčné linie (značených jako mock), se produkt této velikosti nevyskytuje a vzorek obsahuje pouze endogenní P97 o přibližné velikosti 100 kDa. Referenční β -aktin (produkt o přibližné velikosti 50 kDa) i endogenní P97 se vyskytují ve všech vzorcích ve stejné míře, kdežto P97-GFP je v buněčné linii U-2 OS zastoupen hojněji (Obr. 18). Z toho lze usuzovat, že bude tato linie vykazovat stabilnější expresi P97-GFP a pro následující experimenty bude tak vhodnější.



Obr. 18: Průkaz úspěšné transfekce buněčných linií H1299 a U-2 OS vektorem pCMV6-VCP-GFP. Mock značí kontrolní vzorky parentální buněčné linie. Tyto vzorky proto vykazují pouze produkt o přibližné velikosti 100 kDa, který odpovídá relativní molekulové hmotnosti endogenní segregázy P97. Produkt o velikosti mezi 100 a 150 kDa odpovídá exogenní segregáze P97 s navázanou GFP značkou. Tento produkt je přítomen v transfekovaných vzorcích obou buněčných linií. β -aktin přítomný ve všech vzorcích slouží jako kontrola nanesení vzorků.

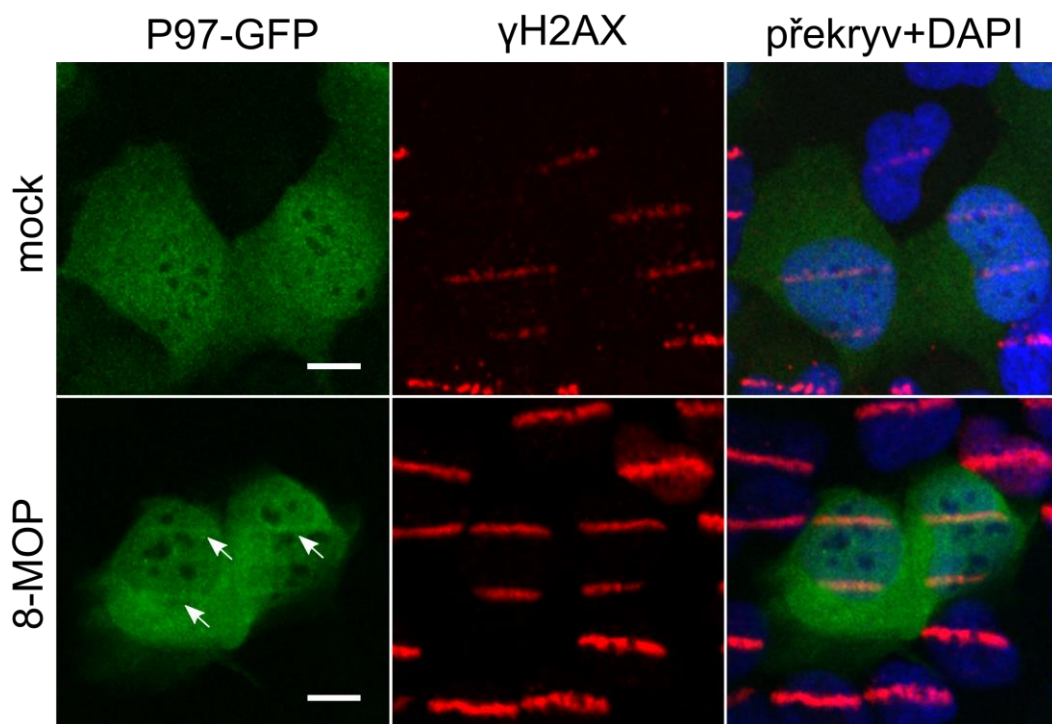
5.2 Efekt spolupůsobení UV-A, 8-methoxypsoralenu a různých inhibitorů složek UPS na dynamiku proteinů zapojených do DDR

K významnému pokroku v identifikaci a charakterizaci klíčových proteinů zapojených do odpovědi na poškození DNA došlo díky zavedení důležité metody, tzv. laserové mikroiradiace. Tato technika umožňuje v buňkách generovat místně specifické poškození DNA, včetně dvouvláknových zlomů (DSB), pomocí laserů spojených s fluorescenčními mikroskopy (Kim *et al.*, 2019). Může být doprovázena a podporována buněčnou fotosenzitizací 8-methoxypsoralenu (8-MOP), halogenovými analogy thymidinu (bromodeoxyuridin; BrdU) nebo interkalačními činidly (Hoechst) (Polo *et Jackson*, 2011; Limoli *et Ward*, 1993). Po indukci poškození ve formě stripů, viz. kapitola 4.4.6, mohou být proteiny analyzovány v živých nebo fixovaných buňkách za účelem studia prostorové, časové a koordinované dynamiky proteinů zapojených do reakce na poškození DNA (Kim *et al.*, 2019). Na buněčných liniích U-2 OS se stabilní expresí Ub-GFP, P97-GFP a NPL4-GFP, H1299 se stabilní expresí P97-GFP a mutantních U-2 OS-(MUT)-NPL4-GFP bylo sledováno rekrutování GFP-značených proteinů do laserem poškozených oblastí v DNA.

5.2.1 P97-GFP kolokalizuje se signálem γ H2AX po fotoaktivaci 8-methoxypsoralenu

P97/VCP segregáza zajišťuje odstranění polyubikvitinovaných proteinových substrátů a je proto zásadním faktorem regulujícím opravu poškození DNA (Meyer *et al.*, 2012; Vaz *et al.*, 2013). Aby byl otestován vliv presenzitizačního činidla 8-MOP na indukci poškození DNA laserovou mikroiradiací a byla tak potvrzena translokace P97 do míst poškození, byla na buněčné linii U-2 OS se stabilní expresí P97-GFP provedena imunofluorescence s protilátkou proti známému markeru poškozené DNA (γ H2AX). Buňky byly vždy presenzitizovány činidlem 8-MOP 30 minut před samotnou laserovou mikroiradiací.

Bylo pozorováno, že marker poškozené DNA γ H2AX (červený signál) byl v oblasti dráhy laseru (stripu) přítomen a P97-GFP se v těchto místech rovněž shlukoval (zelený signál), což potvrzuje lokalizaci P97-GFP v místech poškození (**Obr. 19**). Ze snímků konfokální imunofluorescenční analýzy je patrné, že kolokalizaci P97-GFP a γ H2AX vykazují až buňky vystavené 8-methoxypsoralenu (8-MOP). Působením UV-A totiž dochází k fotoaktivaci tohoto činidla (Hovest *et al.*, 2006; Dardalhon *et al.*, 2007), což způsobuje silnější poškození DNA, jak je patrné z intenzity signálu γ H2AX. Při slabší míře poškození DNA v buňkách vystavených pouze UV-A nedošlo k viditelné akumulaci P97-GFP v místě poškození (**Obr. 19**).

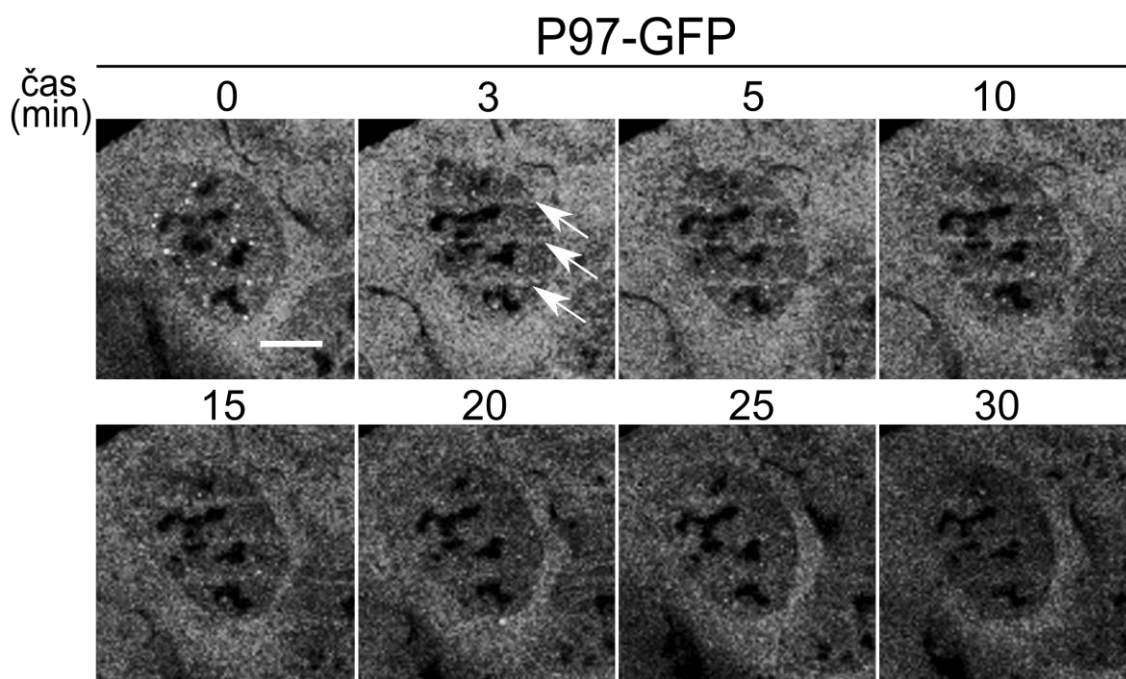


Obr. 19: P97-GFP kolokalizuje se signálem γ H2AX po fotoaktivaci 8-methoxypsoralenu. Bez působení 8-MOP nebylo pozorováno viditelné rekturování P97-GFP do míst poškození, ale k signalizaci γ H2AX v malé míře docházelo. Po působení 8-MOP bylo shlukování P97-GFP v místě dráhy laseru (značeno bílými šipkami) pozorováno. DNA byla navíc fotoaktivací 8-MOP silně poškozena a docházelo k tvorbě výraznějšího signálu γ H2AX. Buněčná jádra byla dobarvena DAPI (modrý signál). Měřítko činí 10 μ m.

5.2.2 Prostorová a časová dynamika P97-GFP při rekrutování do míst laserového poškození

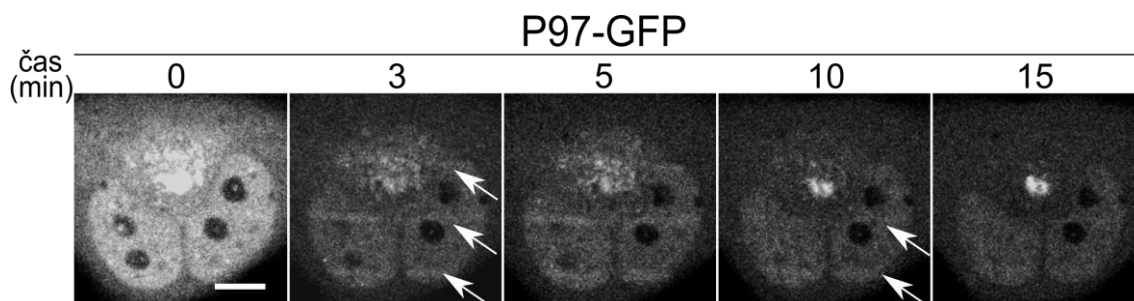
P97 se připojuje k ubikvitinovaným řetězcům v místech DSB prostřednictvím kofaktorového komplexu UFD1-NPL4 (UN), který disponuje ubikvitin vazebnou doménou (Meyer *et al.*, 2002; Meerang *et al.*, 2011; Asc *et al.*, 2011) Jakmile se tedy komplex P97-UN nachází v místech poškození DNA, dochází k segregaci ubikvitinovaných substrátů, což vede k útlumu signalizační kaskády ubikvitinu v místech poškození DNA a k vazbě dalších proteinů účastnících se oprav DNA (Meerang *et al.*, 2011; Torrecilla *et al.*, 2017).

Pro pozorování přesné dynamiky proteinu bylo v 8-MOP presenzitizovaných buňkách U-2 OS se stabilní expresí P97-GFP sledováno rekrutování GFP-značeného proteinu po indukci laserové mikroiradiace. Viditelné rekrutování P97-GFP do míst poškození bylo pozorováno již ve třetí minutě od indukce poškození (**Obr. 20**) a setrvalo až do třicáté minuty, kdy se začal signál pomalu vytrácet.



Obr. 20: Časová a prostorová dynamika P97-GFP v reakci na indukované poškození DNA pozorovaná na buněčné linii U-2 OS. Ve třetí minutě po laserové mikroiradiaci lze pozorovat v 8-MOP presenzitizovaných buňkách shlukování P97-GFP do míst poškození (značeno šipkami) a tento signál postupem času slábne. Měřítko činí 10 μm .

Jelikož byl P97 hlavním zájmovým proteinem této práce, byla jeho dynamika pozorována také v buněčné linii H1299-P97-GFP. Jak bylo již avizováno v kapitole 5.1, exprese GFP-značeného proteinu nebyla tak silná, jako ve druhé pozorované linii U-2 OS-P97-GFP. Nicméně bylo prokázáno, že translokace P97-GFP do míst poškození probíhá i v této linii během třetí minuty od laserové mikroiradiace, ale jeho signál slábne mnohem dříve, a to během 15 minuty od indukce poškození (**Obr. 21**).

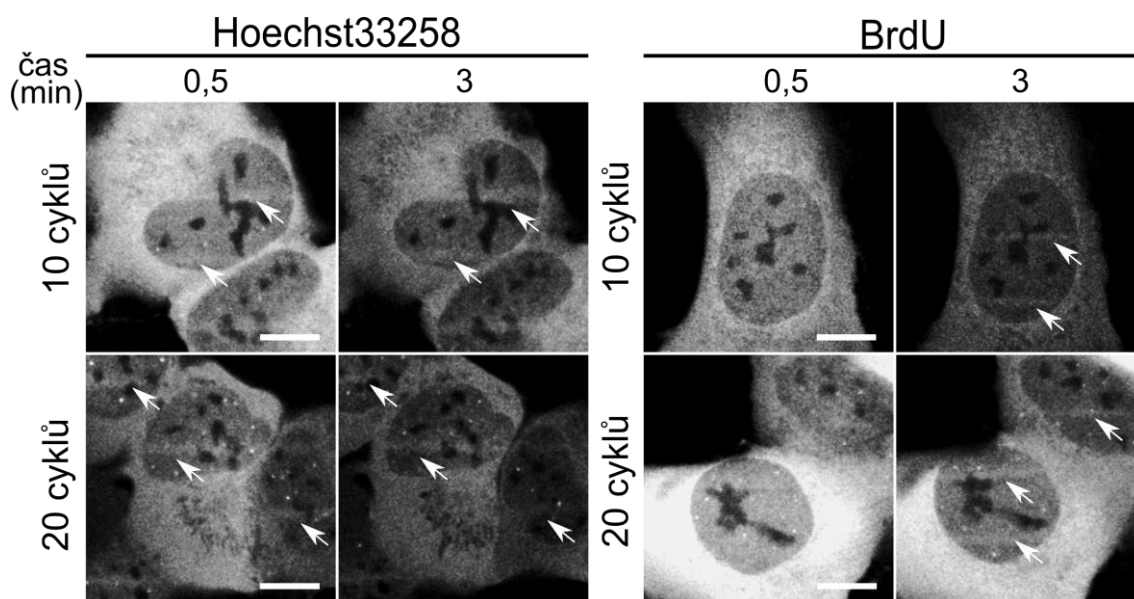


Obr. 21: Časová a prostorová dynamika P97-GFP v reakci na indukované poškození DNA pozorovaná na buněčné linii H1299. Ve třetí minutě od indukce poškození lze pozorovat v 8-MOP presenzitizovaných buňkách shlukování P97-GFP do míst lézí (značeno šipkami) a tento signál postupem času slábne. Měřítko činí 10 μm .

5.2.3 P97-GFP se rekrutuje do míst poškození i při presenzitizaci buněk BrdU a Hoechst33258

Ve dvou buněčných liniích se podařilo prokázat, že po ošetření buněk presenzitizačním činidlem 8-MOP dochází k rekrutování P97-GFP do míst dvouvláknových zlomů přibližně po třech minutách od indukce laserové mikroiradiace (**Obr. 20 a 21**). Dále bylo zkoumáno, zda bude translokace P97-GFP do míst poškození probíhat také po ošetření buněk jinými presenzitizačními činidly. Byl studován vliv 5-brom-2'-deoxyuridinu (BrdU) a Hoechst33258 na rekrutování P97-GFP v buněčné linii U-2 OS se stabilní expresí tohoto GFP-značeného proteinu.

Podařilo se prokázat, že k rekrutování P97-GFP dochází jak v buňkách vystavených působení BrdU, tak v buňkách vystavených působení Hoechst33258 (**Obr. 22**). Činidlo BrdU způsobilo translokaci P97-GFP do míst poškození po třech minutách od indukce stripů. Bylo tedy dosaženo stejného efektu jako po vystavení buněk presenzitizačnímu činidlu 8-MOP. Zajímavých výsledků však bylo dosaženo po vystavení buněk činidlu Hoechst33258. V těchto buňkách bylo rekrutování P97-GFP pozorováno ihned po indukci laserové mikroiradiace. V návaznosti na to by bylo velmi zajímavé studovat, zda by Hoechst33258 ovlivnil stejným způsobem rychlost translokace dalších proteinů zapojených do DDR.

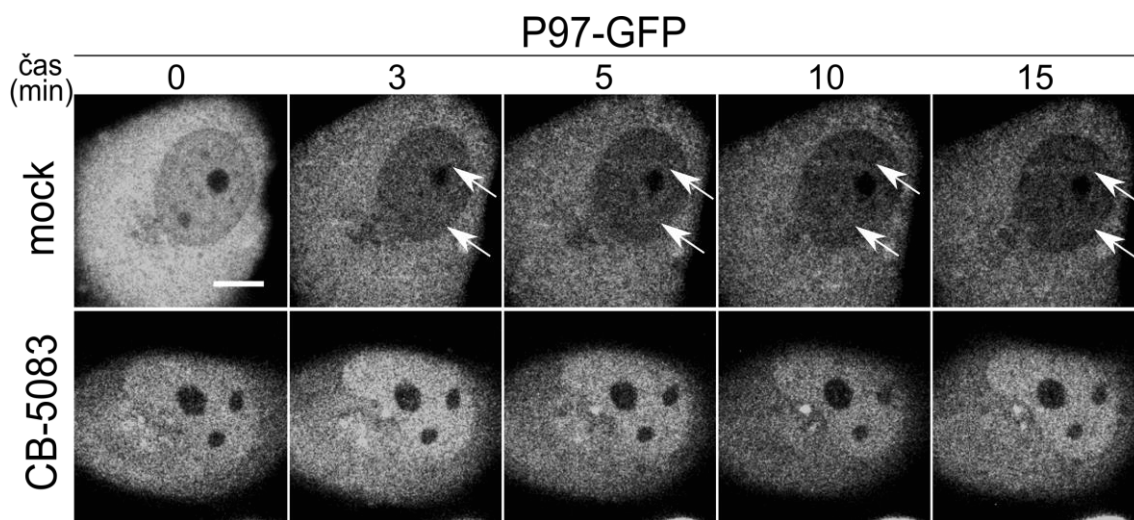


Obr. 22: Vliv presenzitizačních činidel Hoechst33258 a BrdU na rekrutování P97-GFP. Po vystavení buněk U-2 OS se stabilní expresí P97-GFP laserové mikroiradiaci bylo rekrutování P97-GFP (vyznačeno šipkami) pozorováno v případě ošetření činidlem Hoechst33258 po 30 sekundách od indukce stripů a po 3 minutách od indukce stripů v případě ošetření buněk BrdU. Měřítka činí 10 μm .

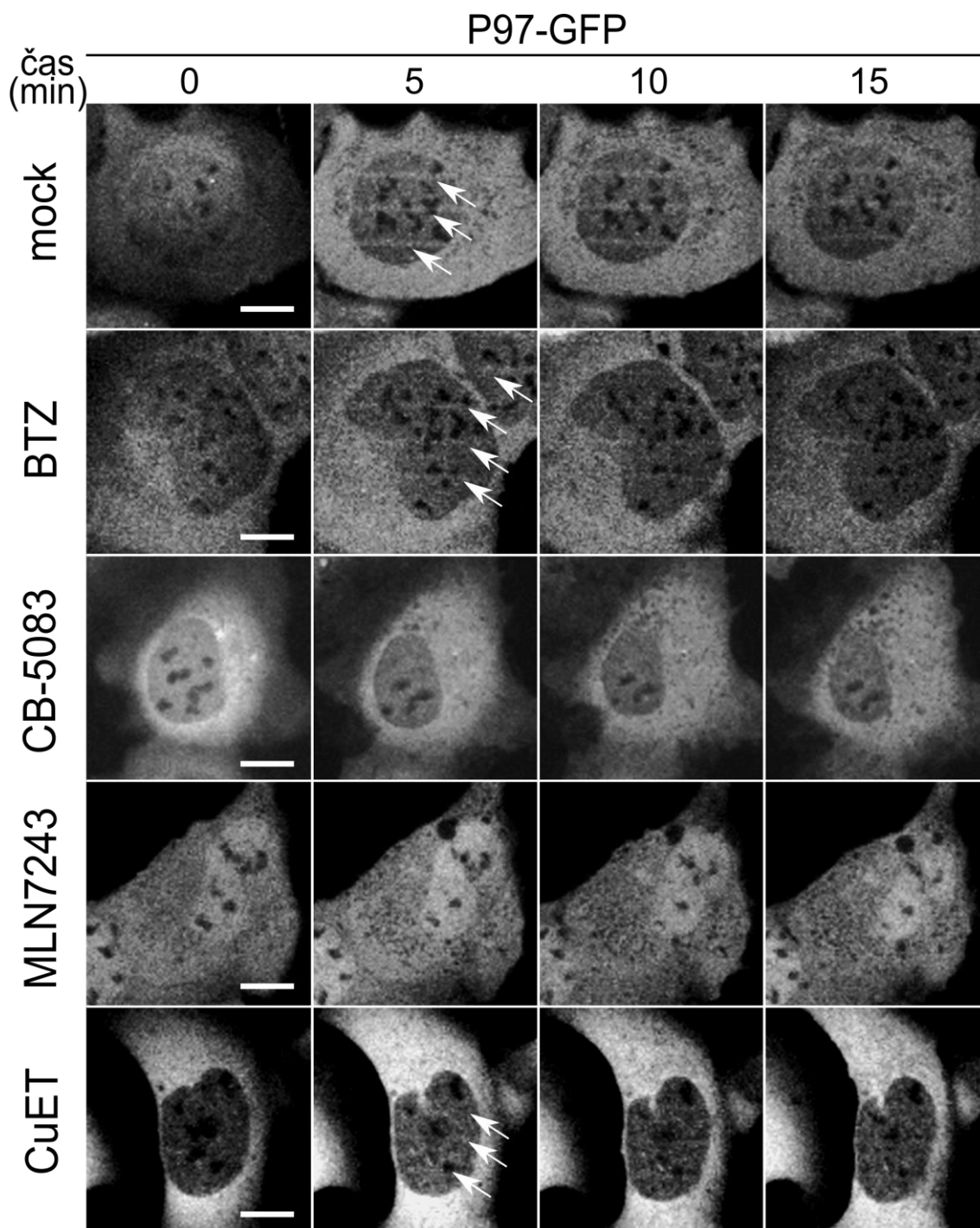
5.2.4 Různé inhibitory složek UPS zamezují rekrutování P97-GFP v místě poškození DNA

Dále bylo studováno, jaký vliv budou mít na rekrutování P97-GFP v místech poškození různé inhibitory složek ubikvitin-proteazomového systému. Na buňky U-2 OS se stabilní expresí P97-GFP působily inhibitory UPS 1 hodinu, konkrétně se jednalo o inhibitor 20S proteazomu Bortezomib (1 μM), inhibitor P97 CB-5083 (5 μM), inhibitor ubikvitin-aktivačního enzymu UBA1 MLN7243 (5 μM) a inhibitor funkce NPL4 CuET (250 nM). Poté byly buňky 30 minut presenzitizovány činidlem 8-MOP a vystaveny laserové mikroiradiaci.

Bylo pozorováno, že Bortezomib (BTZ) oslabil oproti kontrole translokaci P97-GFP do míst indukovaného poškození DNA. Oslabené rekrutování P97-GFP do míst lézí bylo pozorováno také v buňkách ošetřených CuET (**Obr. 24**). Publikace Rycenga *et al.* (2019) uvádí, že ztráta ubikvitinu brání akumulaci P97. Pro simulování deplece ubikvitinu byl v této diplomové práci využit inhibitor ubikvitin-aktivačního enzymu MLN7243, po jehož působení opravdu k žádnému rekrutování P97-GFP v místě laserového poškození nedošlo (**Obr. 24**). Rekrutování P97-GFP v místech poškození DNA nebylo pozorováno ani po ošetření buněk inhibitorem CB-5083. Tento efekt úplné inhibice translokace P97-GFP do míst lézí DNA způsobený CB-5083 byl pozorován na příkladu dvou buněčných linií, U-2 OS-P97-GFP a H1299-P97-GFP (**Obr. 23 a 24**).



Obr. 23: Vliv CB-5083 na rekrutování P97-GFP v místě poškození na příkladu buněčné linie H1299. Inhibitor CB-5083 (5 μM) zabránil shlukování P97-GFP v místě laserového poškození. Měřítka činí 10 μm .

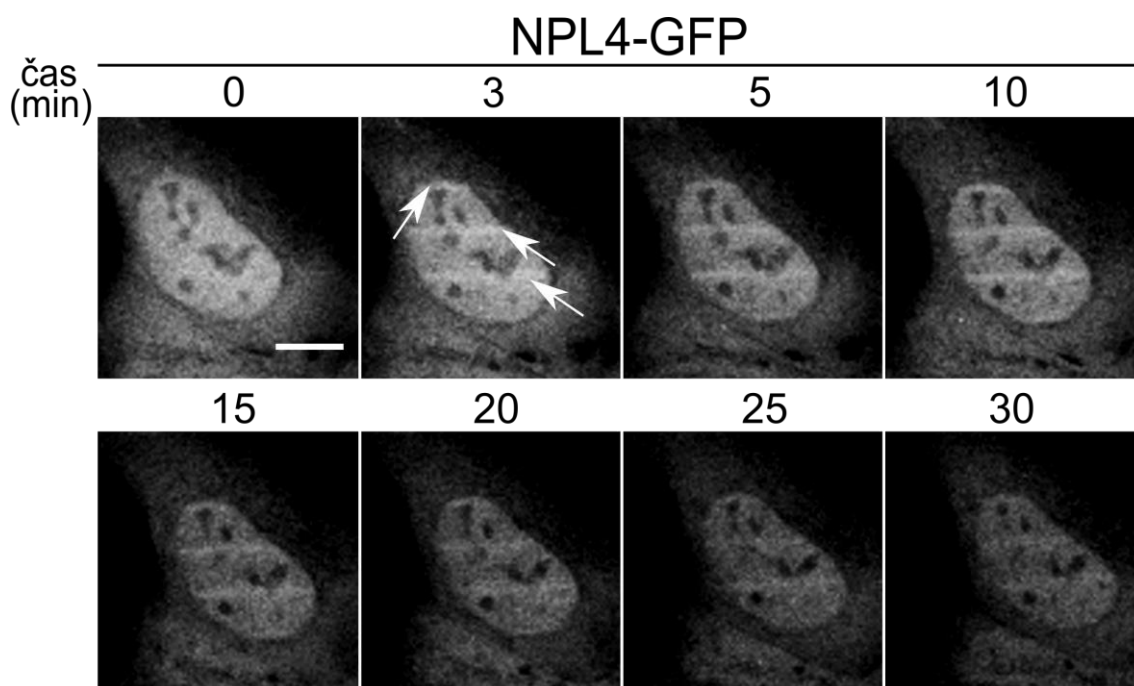


Obr. 24: Vliv různých inhibitorů UPS na rekrutování P97-GFP v místě poškození na příkladu buněčné linie U-2 OS. Rekrutování P97-GFP v místech poškození (značeno šipkami) bylo pozorováno v buňkách ošetřených 1 μ M Bortezomibu (BTZ) a 0,25 μ M CuET. Inhibitory CB-5083 (5 μ M) a MLN7243 (5 μ M) shlukování P97-GFP v místě poškození plně zabránily. Měřítka činí 10 μ m.

5.2.5 NPL4 se rekrutuje do míst poškození DNA

P97 je cílena na místa poškození DNA prostřednictvím polyubikvitinačních signálů, které jsou rozeznávány jeho vazebným kofaktorem NPL4 (Asc *et al.*, 2011). Na základě toho bylo sledováno, zda se NPL4-GFP rekrutuje do míst poškozené DNA a s jakou kinetikou. Buňky buněčné linie U-2 OS se stabilní expresí NPL4-GFP byly ošetřeny prezenzitizačním činidlem 8-MOP a poté vystaveny laserové mikroiradiaci.

Bylo pozorováno, že čas rekrutování NPL4-GFP přesně odpovídá času shlukování P97-GFP v místech laserového poškození. Rekrutování proteinu začíná ve třetí minutě od indukce poškození, stejně jako u jeho vazebného partnera, a signál slábne ve třicáté minutě od mikroiradiace (Obr. 25). To potvrzuje, že se P97-GFP do míst poškození DNA váže spolu s NPL4-GFP.

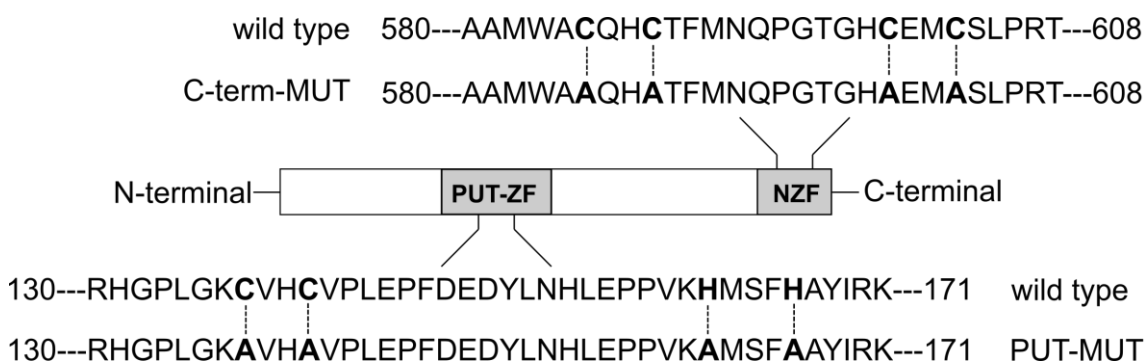


Obr. 25: Časová a prostorová dynamika NPL4-GFP v reakci na indukované poškození DNA pozorovaná na buněčné linii U-2 OS. Ve třetí minutě po laserové mikroiradiaci lze pozorovat v 8-MOP ošetřených buňkách shlukování NPL4-GFP do míst laserového poškození (značeno šipkami) a tento signál postupem času slábne. Měřítka činí 10 μm .

5.2.6 Vliv mutací NPL4 na schopnost vázat ubikvitin

Jak již bylo zmíněno v literárním přehledu, NPL4 je schopna vázat ubikvitin prostřednictvím specifické domény s motivem zinkových prstů, tzv. NZF (NPL4 Zinc Finger), vyskytující se v C-terminální oblasti proteinu (Meyer *et al.*, 2002). Dále disponuje putativní doménou zinkového prstu (ZF-NPL4) v konzervativní oblasti od 113-255 aminokyseliny (Lass *et*

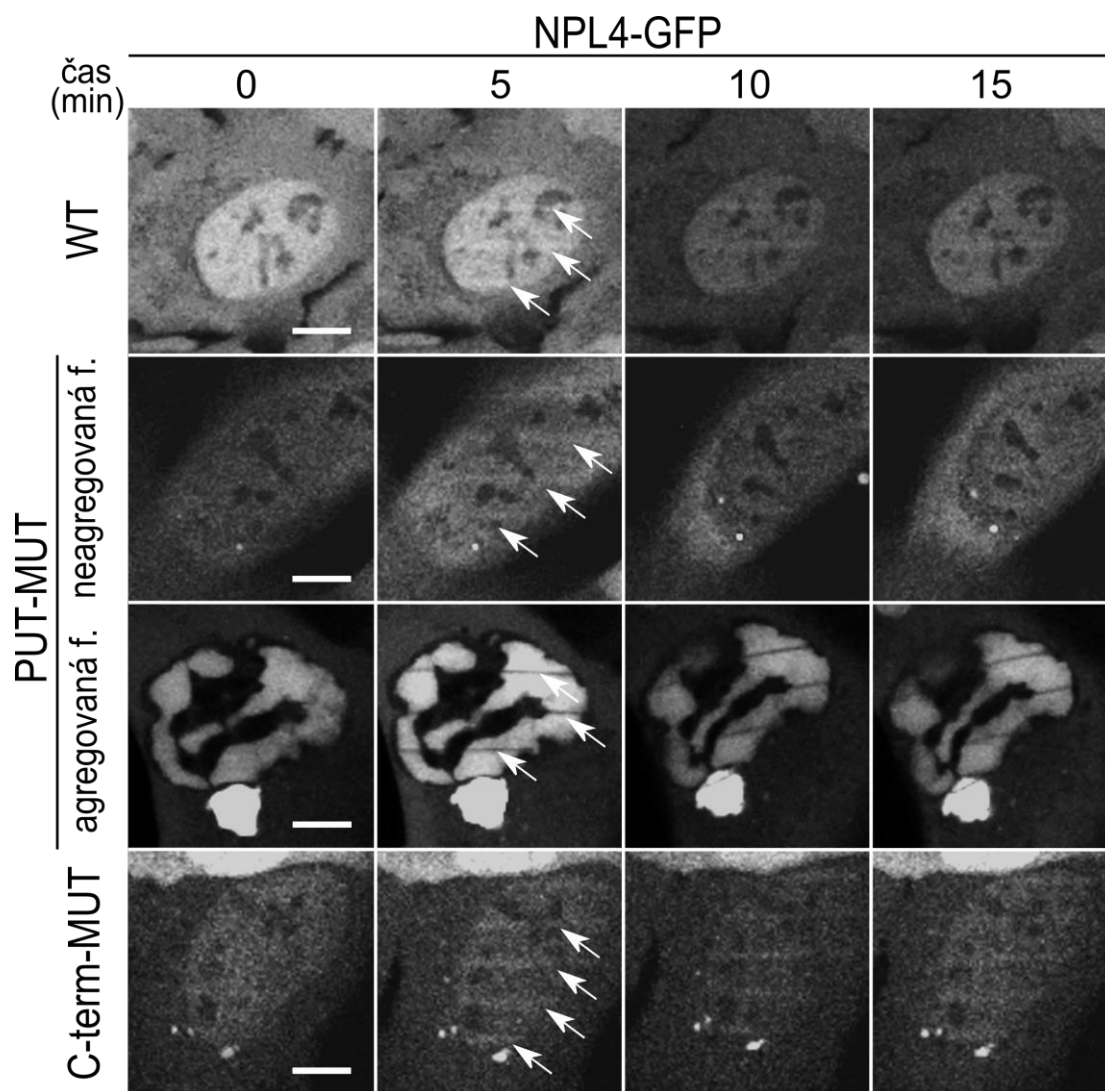
al., 2008). Vyvstala tedy otázka, jaký vliv na vazbu ubiquitinu by mutace těchto motivů mohly mít. Byly proto použity dvě dříve laboratoří vytvořené mutantní buněčné linie U-2 OS s doxocyklinem indukovanou expresí NPL4-GFP. První mutantní buněčná linie nesla mutaci v doméně NZF, proto byla označena jako C-terminal NZF-MUT (zkr. C-term-MUT). V této linii byly cysteiny v pozicích 586, 589, 600 a 603 nahrazeny alaniny. Ve druhé mutantní buněčné linii byly cysteiny v pozicích 138 a 141 a histidiny v pozicích 161 a 165 nahrazeny alaniny a linie byla pojmenována putative (anglický název pro „domnělý“) ZF-MUT (zkr. PUT-MUT) (Škrott *et al.*, 2017). Změny v aminokyselinové sekvenci jsou znázorněny na **Obr. 26**.



Obr. 26: Sekvence aminokyselin NPL4 proteinu v mutantních buněčných liniích.

U C-terminální mutanty (C-term-MUT) jsou cytosiny zinkových prstů zaměněny za alaniny, u putative mutanty (PUT-MUT) jsou cytosiny a histidiny zinkových prstů zaměněny za alaniny. Převzato ze Škrott *et al.*, 2017 a upraveno.

Jelikož se předpokládá, že je za rozpoznání a vazbu ubiquitinu zodovědná primárně NZF doména (Meyer *et al.*, 2002; Lass *et al.*, 2008), bylo očekáváno, že mutace v tomto motivu bude mít za následek inhibici rekrutování NPL4 na polyubikvitinované proteiny v místě laserového poškození. Překvapivě však k takovému efektu v C-term-MUT buněčné linii nedošlo, a v místech poškození DNA byla pozorována poměrně silná akumulace tohoto GFP-značeného proteinu (**Obr. 27**). Další motiv zinkového prstu, oblast ZF-NPL4, je důležitý pro vazbu proteinového kofaktoru UFD1. V publikaci Lass *et al.* (2008) bylo pozorováno, že delece tohoto zinkového prstu vede k tvorbě cytoplazmatických a jaderných agregátů proteinu. Nebylo tedy překvapivé, že mutantní linie PUT-MUT vykazovala fenotyp projevující se tvorbou agregovaných forem s klastry NPL4-GFP. Agregovaná imobilní forma proteinu se do míst poškození nerekrutovala, a proto bylo možno pozorovat „negativní stripý“, které vznikly pravděpodobně jako důsledek vysvícení (tvz. vybleachování) lokálně stabilního signálu PUT-MUT NPL4-GFP. Kromě agregované formy bylo v této buněčné linii možno pozorovat signál difúzní neagregované formy, která umožnila slabé rekrutování NPL4 v místě poškození DNA (**Obr. 27**).



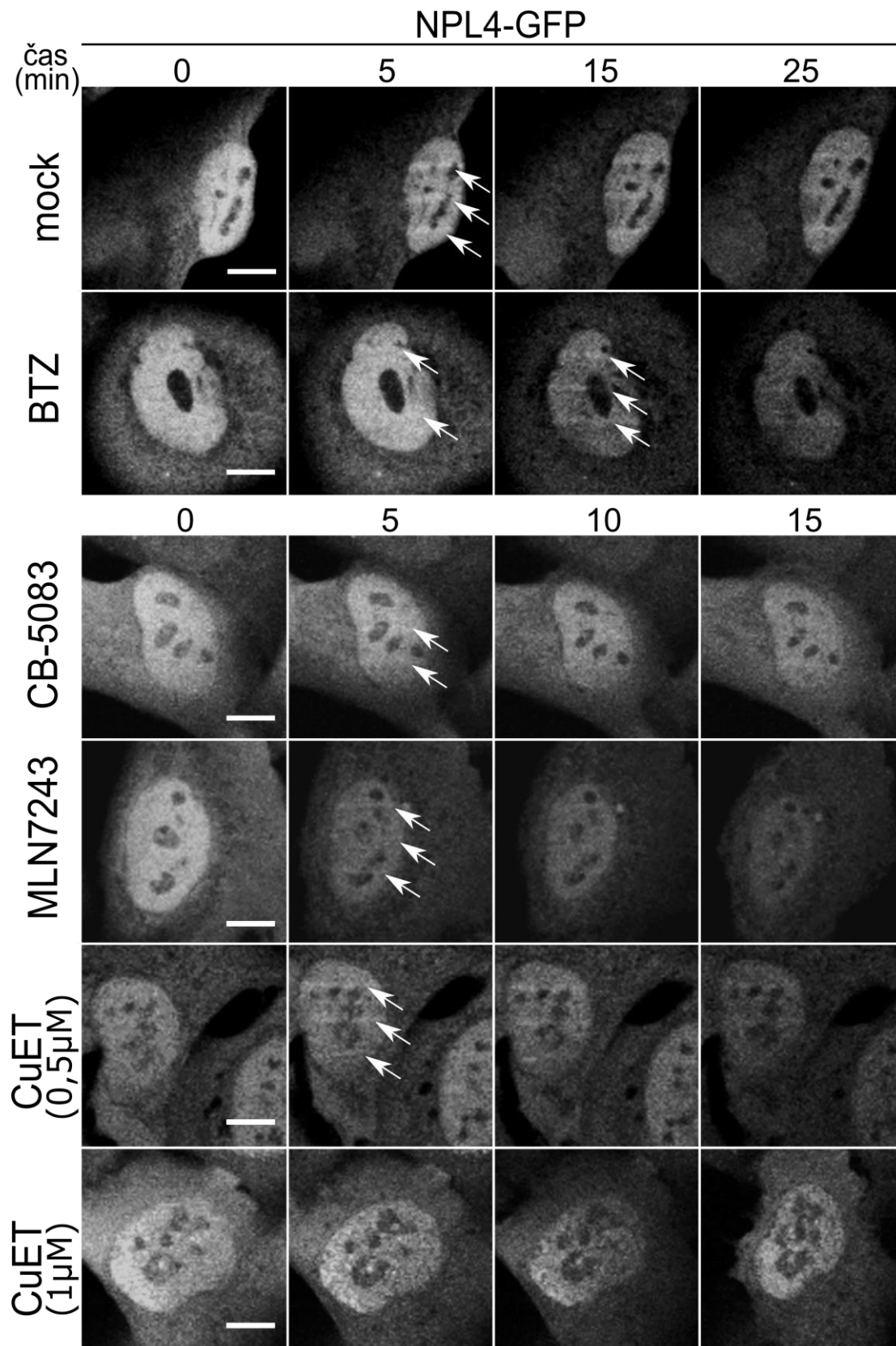
Obrázek 27: Vliv mutací NPL4 na vazbu ubikvitinu. Na mutacích buňkách buněčných linií PUT-MUT a C-term-MUT byla sledována vazba ubikvitinu do míst indukovaného poškození (označeno šipkami). Měřítka činí 10 μm .

5.2.7 Vliv různých inhibitorů složek UPS na rekrutování NPL4-GFP

Na buněčné linii U-2 OS se stabilní expresí NPL4-GFP byl pozorován vliv akumulace značeného proteinu v místě indukovaného poškození. Na buňky U-2 OS se stabilní expresí NPL4-GFP působily 1 hodinu inhibitory různých složek UPS, konkrétně inhibitor 20S proteazomu Bortezomib (1 μM), inhibitor P97 CB-5083 (5 μM), inhibitor ubikvitin-aktivačního enzymu UBA1 MLN7243 (5 μM) a inhibitor funkce NPL4 CuET (0,5 a 1 μM). Buňky byly poté 30 minut presenzitizovány činidlem 8-MOP a vystaveny laserové mikroiradiaci.

Po ošetření buněk Bortezomibem došlo k rekrutování NPL4-GFP do oblasti poškození DNA, stejně jako to bylo pozorováno na příkladu P97-GFP. Po vystavení buněk působení inhibitoru CB-5083 bylo pozorováno jen velmi slabé shlukování GFP-značeného proteinu v místě

poškození. Tento slabý signál NPL4-GFP byl pozorován také po působení MLN7243 (**Obr. 28**). Po působení CuET (1 μ M) byla indukována tvorba proteinových klastrů připomínající události pozorované v mutantních buňkách PUT-MUT (**Obr. 27**). Při užití 0,5 μ M koncentrace CuET k omezenému rekrutování NPL4-GFP do míst laserového poškození ještě docházelo (**Obr. 28**).

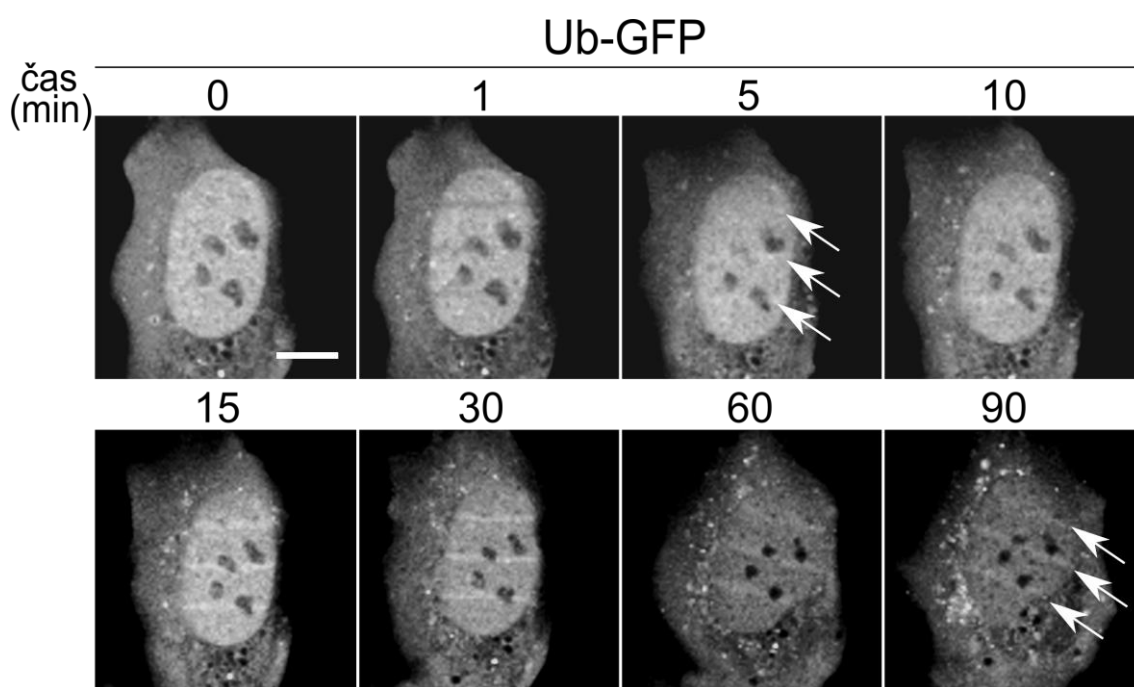


Obr. 28: Vliv různých inhibitorů UPS na rekrutování NPL4-GFP v místě poškození na příkladu buněčné linie U-2 OS. Shlukování NPL4-GFP v místech poškození (značeno šipkami) bylo v rozličných intenzitách pozorováno ve všech testovaných buňkách. Nejintenzivnější rekrutování NPL4-GFP probíhalo v kontrolních buňkách (mock), slabší signál NPL4-GFP byl pozorován po působení 1 μM Bortezomibu (BTZ) a 0,5 μM CuET. Inhibitory CB-5083 (5 μM) a MLN7243 (5 μM) způsobovaly v místě poškození jen mírné shlukování GFP-značeného proteinu. CuET se v 1 μM koncentraci projevilo tvorbou proteinových agregátů. Měřítka činí 10 μm .

5.2.8 Laserem indukované poškození DNA způsobuje akumulaci ubikvitinu v místě DBS

Fúzní GFP-značené ubikvitiny (Ub-GFP) jsou funkčně konjugovány se substráty a vykazují obdobnou lokalizaci jako endogenní ubikvitin (Qian *et al.*, 2002). Proto byl Ub-GFP využit pro studium ubikvitinačního signálu v místech indukovaného poškození DNA. Buňky buněčné linie U-2 OS se stabilní expresí Ub-GFP byly presenzitizovány činidlem 8-MOP a poté vystaveny laserové mikroiradiaci.

Počáteční vysvícení fluoroforu GFP v exponované oblasti pozorované v první minutě od mikroiradiace následovalo rychlou lokální akumulací fluorescenčního Ub-GFP do oblasti vystavené laseru. Viditelná vazba Ub-GFP byla sledována v páté minutě od indukce poškození a akumulace proteinu setrvala až do devadesáté minuty (**Obr. 29**). Brzká akumulace Ub-GFP v místě dráhy laseru tedy jasně potvrzuje jeho důležitou roli při signalizaci poškození DNA. To je v souladu s dříve zmiňovanou studií Doil *et al.* (2009), která uvádí, že mezi nejrychlejšími proteiny akumulujícími se v místech DBS jsou pro ubikvitinaci nezbytné RNF ligázy.

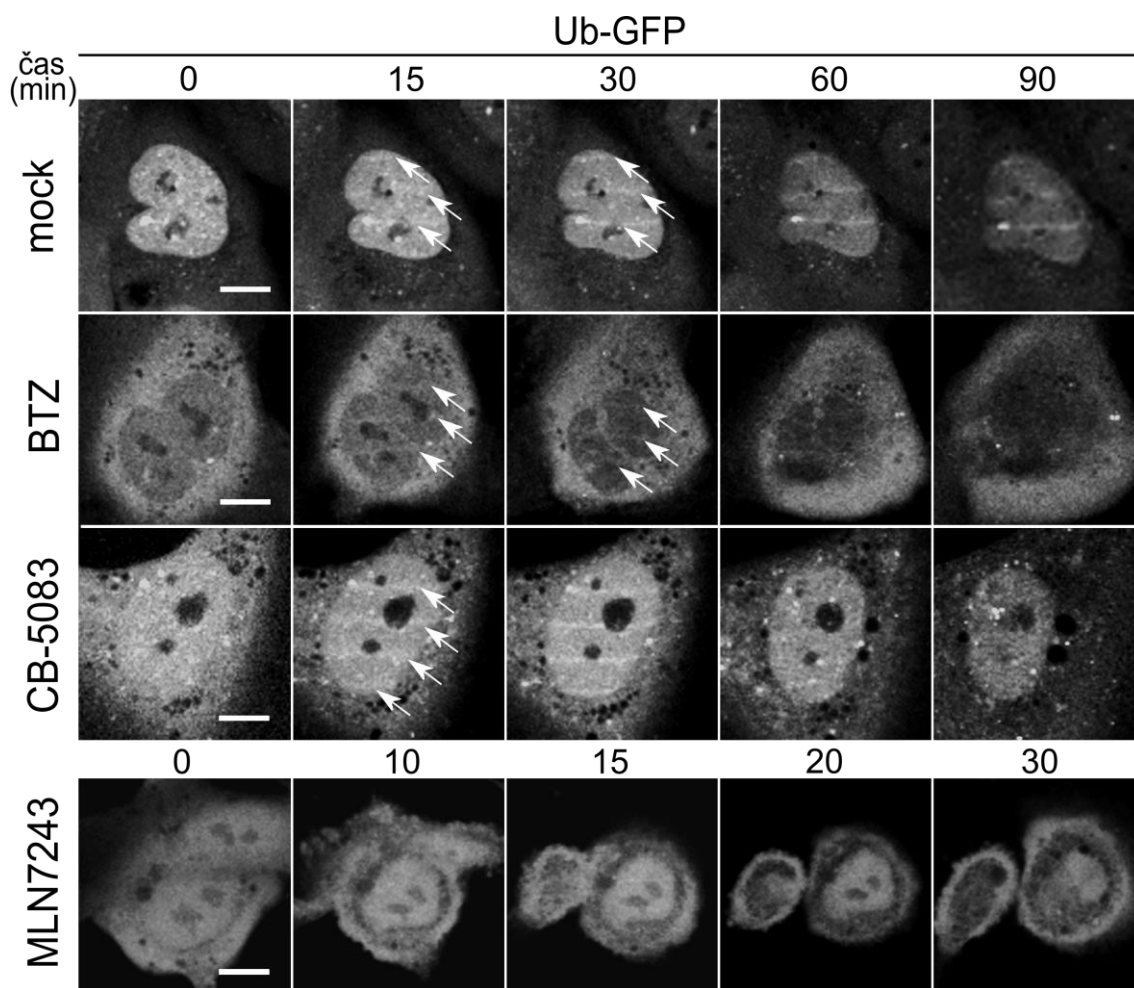


Obr. 29: Časová a prostorová dynamika Ub-GFP v reakci na indukované poškození DNA pozorovaná na buněčné linii U-2 OS. Signál Ub-GFP v 8-MOP presenzitizovaných buňkách je v místech lézí (označeno šipkami) viditelný v páté minutě od indukce poškození, kulminuje mezi 15 a 30 minutou a přetrvává až do 90. minuty. Měřítka činí 10 μm .

5.2.9 Vliv inhibitorů různých složek UPS na rekrutování Ub-GFP do míst poškození DNA

Na buňky U-2 OS se stabilní expresí Ub-GFP působily 1 hodinu inhibitor 20S proteazomu Bortezomib (1 μM), inhibitor P97 CB-5083 (5 μM) a inhibitor ubikvitin-aktivujícího enzymu UBA1 MLN7243 (5 μM). Poté byly buňky 30 minut presenzitizovány činidlem 8-MOP a vystaveny laserové mikroiradiaci.

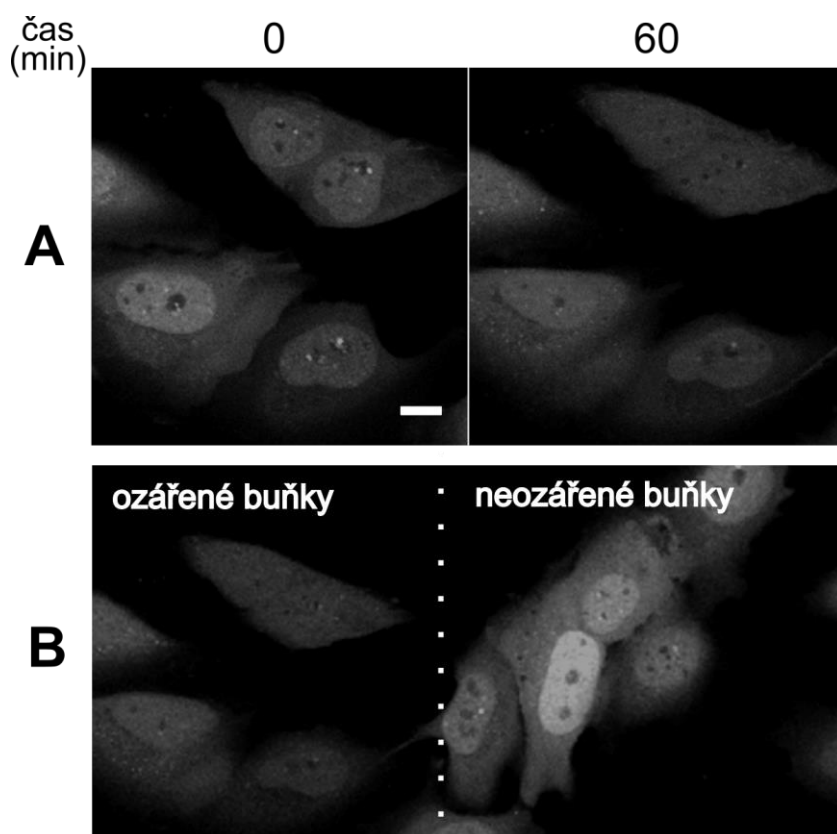
Oproti kontrolním buňkám (mock), kde byl signál Ub-GFP stabilní a pozorovatelný i po 90 minutách od mikroiradiace (**Obr. 29** a **30**), se působení Bortezomibu (BTZ) projevilo slabší akumulací GFP-značeného ubikvitinu v místech poškození. Tato akumulace Ub-GFP vrcholila ve 30 minutách od indukce poškození a následovala postupným poklesem zásob GFP-značeného ubikvitinu z modifikovaných histonů projevujícím se pomalu slábnoucím signálem v místě stripu (**Obr. 30**). Na rozdíl od BTZ, po jehož působení nebylo pozorováno výraznější rekrutování Ub-GFP, se v buňkách ošetřených CB-5083 jevil signál Ub-GFP v místech poškození oproti kontrolním buňkám silnějším a výraznějším (**Obr. 30**). Vlivem MLN7243, který je silným inhibitorem ubikvitin aktivačních enzymů, dochází k narušení ubikvitinační kaskády, proto nebyl signál Ub-GFP v místech poškození pozorován (**Obr. 30**). Zajímavé je, že kombinací UV-A s inhibitorem MLN7243 došlo k velmi výrazné změně buněčné morfologie naznačující silnou toxicitu této kombinace poškození DNA s inhibicí ubikvitin-aktivačního enzymu.



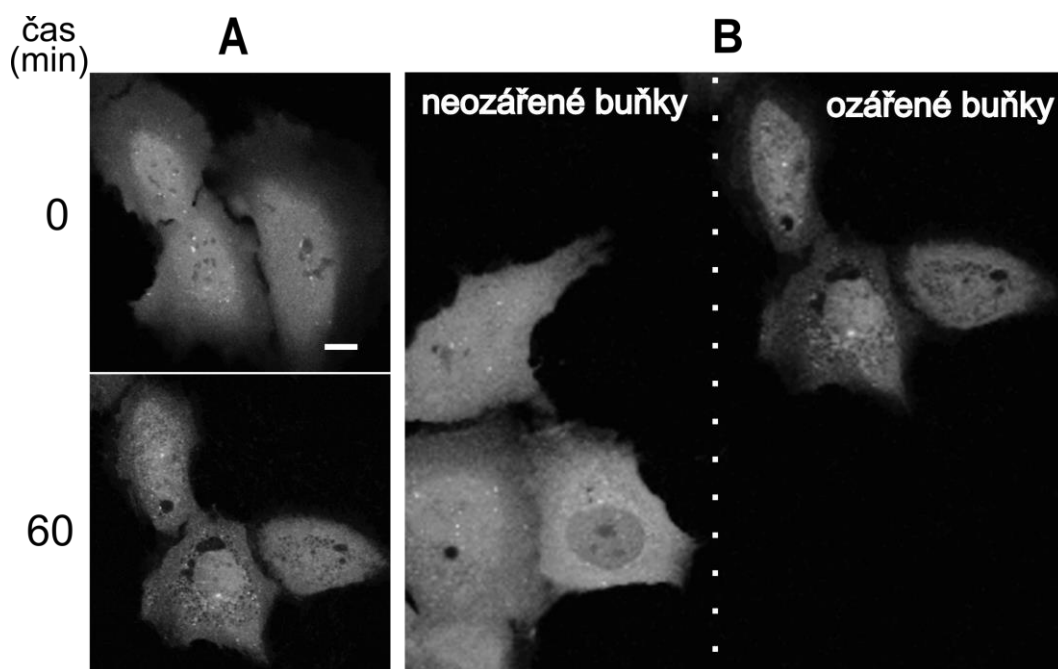
Obr. 30: Vliv různých inhibitorů UPS na rekrutování Ub-GFP v místě poškození na příkladu buněčné linie U-2 OS. Oproti kontrolním buňkám bylo v buňkách ošetřených 1 μM Bortezomibem (BTZ) pozorováno omezené shlukování Ub-GFP (značeno šipkami) v místech laserového poškození. Výraznější signál oproti kontrole však vykazovaly buňky po ošetření 5 μM CB-5083. V buňkách ošetřených MLN7243 (5 μM) rekrutování Ub-GFP pozorováno nebylo. Měřítko činí 10 μm .

5.2.10 Kombinace laserové mikroiradiace a CB-5083 je silně toxická

Při zkoumání vlivu laserové mikroiradiace bylo vypořádáno, že účinky samotného UV-A záření nevedou k výrazným změnám v morfologii buněk (**Obr. 31**). K výrazným změnám v morfologii nedochází ani při vystavení buněk účinkům samotného inhibitoru P97 CB-5083. Až po jejich spolupůsobení jsou patrné velmi výrazné morfologické změny buněk (**Obr. 32**). Vzhledem k tomu, že k takovému stavu došlo až po indukci laserového poškození, je zřejmé, že kombinovaný účinek laserové mikroiradiace a inhibitoru P97 je pro buňky silně toxický, a lze se domnívat, že dochází k jejich vzájemné potenciaci.



Obr. 31: Vliv samotné laserové mikroiradiace na rakovinné buňky U-2 OS se stabilní expresí Ub-GFP. (A) Porovnání buněčné morfologie v čase 0 a 60 minut po mikroiradiaci u kontrolních pre-treatovaných buněk. Měřítka činí 10 μm . (B) Přímé porovnání buněčné morfologie buněk ozářených mikroiradiací se sousedními neozářenými buňkami v čase 70 minut.



Obr. 32: Vliv laserové mikroiradiace na rakovinné buňky U-2 OS se stabilní expresí

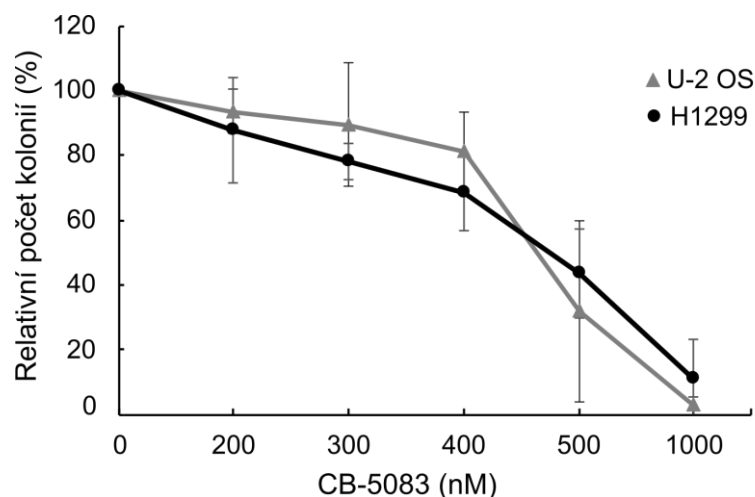
Ub-GFP v kombinaci s inhibitorem CB-5083. (A) Porovnání buněčné morfologie v čase 0 a 60 minut po mikroiradiaci u buněk pre-treatovaných CB-5083. Měřítko činí 10 μm . (B) Přímé porovnání buněčné morfologie buněk ozářených mikroiradiací se sousedními neozářenými buňkami v čase 70 minut.

5.3 Efekt spolupůsobení inhibitoru CB-5083 s IR zářením a běžnými chemoterapeutiky

5.3.1 CB-5083 s IR zářením se vzájemně potencují

Jelikož se ukázalo, že se kombinace inhibitoru CB-5083 s laserovou mikroiradiací projevuje v buňkách velmi silným toxickým účinkem, nabízí se otázka, jaký efekt by mohla mít kombinace CB-5083 s IR zářením, které stejně jako laserová mikroiradiace indukuje v DNA dvouvláknové zlomy. Protože P97 hraje důležitou roli v signalizaci poškození po vystavení ionizujícímu záření (Meerang *et al.*, 2011), mohlo by účinek inhibitoru segregázy CB-5083 potencovat. Pro stanovení možných interakcí inhibitoru CB-5083 s ionizujícím zářením byl využit test tvorby kolonií (CFA; colony formation assay). Jedná se o *in vitro* test založený na schopnosti buněk vytvářet kolonie po ošetření cytotoxických látek nebo po působení ionizujícího záření (Franken *et al.*, 2006), a proto je test vhodný jak ke stanovení účinnosti samotného inhibitoru CB-5083, tak pro stanovení jeho účinků v kombinaci s IR zářením, případně dalšími látkami.

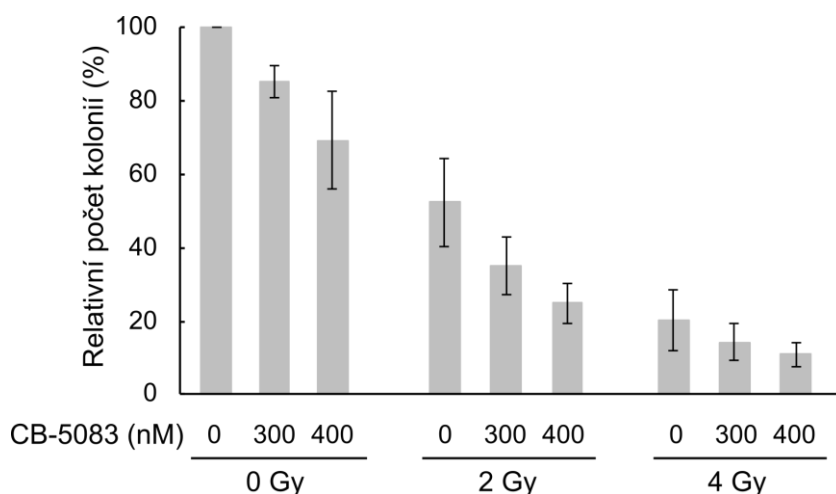
Nejdříve bylo nutné stanovit optimální koncentraci CB-5083, se kterou bude vhodné dále pracovat. Byl sledován efekt různých koncentrací inhibitoru na relativní počet kolonií buněčných linií U2-OS a H1299 (**Obr. 33**). Jako neoptimálnější se jevílo rozmezí koncentrací v hodnotách 300-500 nM. Jelikož se však koncentrace 500 nM projevila v buněčné linii U-2 OS přílišným úbytkem v relativním počtu kolonií, byly pro kombinaci s IR zářením zvoleny koncentrace inhibitoru v hodnotách 300 a 400 nM.



Obr. 33: Křivky přežití buněčných linií U-2 OS a H1299 po působení CB-5083

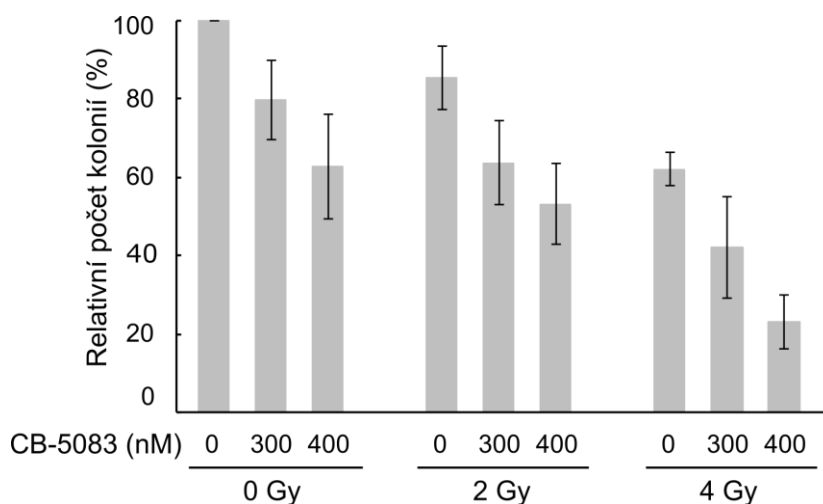
v různých koncentracích. Křivky ukazují průměr hodnot relativního počtu kolonií ze tří nezávislých experimentů a směrodatné odchylky těchto hodnot.

Mimo použití dvou různých koncentrací CB-5083, byly pro studium efektu spolupůsobení inhibitoru segregázy P97 a IR záření zvoleny také dvě dávky ozáření. Buněčná linie U-2 OS byla oproti H1299 na samotnou radiaci senzitivnější (**Obr. 34**). Účinek samotného CB-5083 v 300 nM koncentraci se oproti neošetřeným kontrolním buňkám projevil 15% poklesem v relativním počtu kolonií. Působením 400 nM CB-5083 došlo k téměř dvojnásobnému efektu oproti méně koncentrované dávce tohoto inhibitoru, a bylo dosaženo přibližně 30% poklesu v relativním počtu kolonií. Tento trend byl opisován i při vystavení buněk IR záření. Vystavení buněk dávce 2 Gy se projevilo poklesem relativního počtu kolonií přibližně o 50 % ve všech pozorovaných koncentracích inhibitoru oproti neozařeným buňkám. Dávka IR záření 4 Gy se projevila přibližně dvojnásobným poklesem v počtu buněk tvořících kolonie oproti mírnější dávce ozáření.



Obr. 34: Účinek ionizujícího záření v kombinaci s CB-5083 na příkladu buněčné linie U-2 OS. Sloupcový graf ukazuje průměr hodnot relativního počtu kolonií ze tří nezávislých experimentů a směrodatné odchylky těchto hodnot.

V buněčné linii H1299 nebyl samotný dopad IR záření na buňky tak razantní jako v buněčné linii U-2 OS (**Obr. 35**). Dávka ozáření 2 Gy způsobila přibližně 15% pokles v relativním počtu kolonií oproti buňkám, které IR záření vystaveny nebyly, a to ve všech použitých koncentracích CB-5083. Vystavení buněk vyšší dávce záření, tedy 4 Gy, se projevilo rovněž přibližně 15% poklesem v počtu buněk schopných vytvářet kolonie oproti dávce 2 Gy. Přestože není linie H1299 na působení IR záření tolik senzitivní, bylo pozorováno, že dochází k potenciaci účinku inhibitoru segregázy P97.



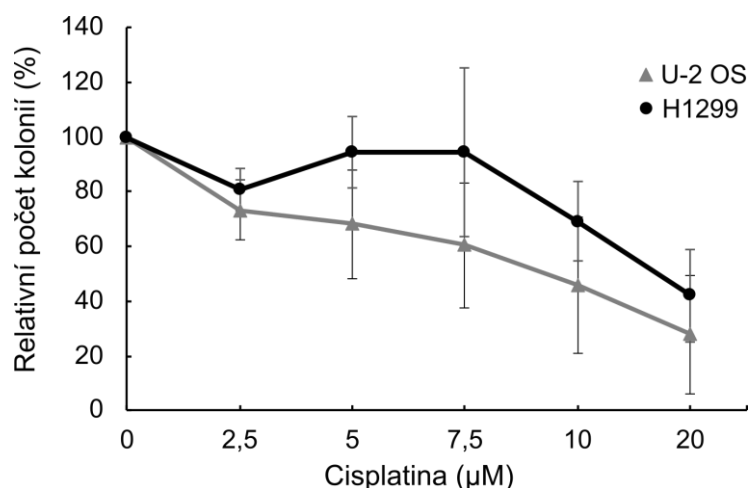
Obr. 35: Účinek ionizujícího záření v kombinaci s CB-5083 na příkladu buněčné linie H1299. Sloupcový graf ukazuje průměr hodnot relativního počtu kolonií ze tří nezávislých experimentů a směrodatné odchylky těchto hodnot.

Kombinované ošetření IR a CB-5083 vede ke snížení relativního počtu buněk tvořících kolonie ve srovnání s buňkami vystavenými samotnému IR. Výsledky tedy jasně ukazují, že kombinace ošetření buněk CB-5083 a jejich vystavení IR působí na rakovinné buňky velmi toxicky. Tato vzájemná potenciace byla prokázána na příkladu dvou buněčných linií.

5.3.2 CB-5083 vykazuje v kombinaci s běžně využívanými chemoterapeutiky cisplatinou a doxorubicinem synergický účinek

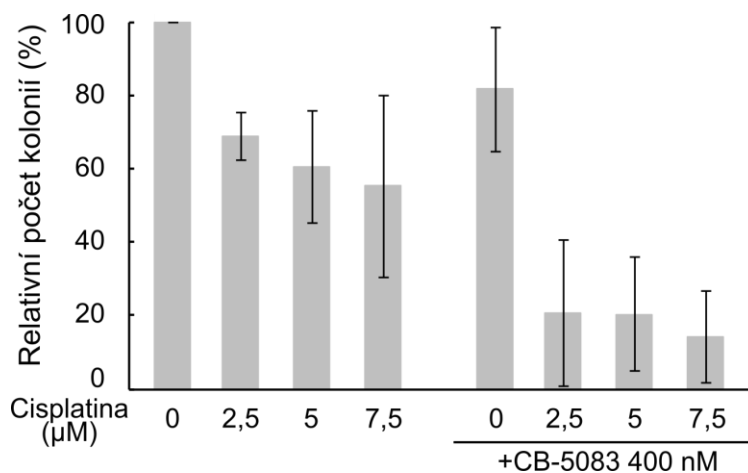
Po potvrzení aditivního účinku IR záření na působení inhibitoru segregázy P97 se naskytla otázka, zda bude takový účinek pozorován také v kombinaci s běžně používanými chemoterapeutiky. V rámci této práce byla použita cisplatina, typické interkalační činidlo, a doxorubicin, látka z třídy antracyklinových antibiotik.

Pro studium interakcí mezi cisplatinou a CB-5083 bylo opět nutné stanovit optimální koncentrace cisplatin, které budou vhodné ke kombinaci s již optimalizovanou koncentrací inhibitoru. Pro stanovení vhodných koncentrací cisplatin byl sledován efekt koncentrační řady chemoterapeutika na schopnost buněčných linií U2-OS a H1299 tvořit kolonie (**Obr. 36**). Za optimální byly v obou buněčných liniích zvoleny koncentrace 2,5-7,5 μM .



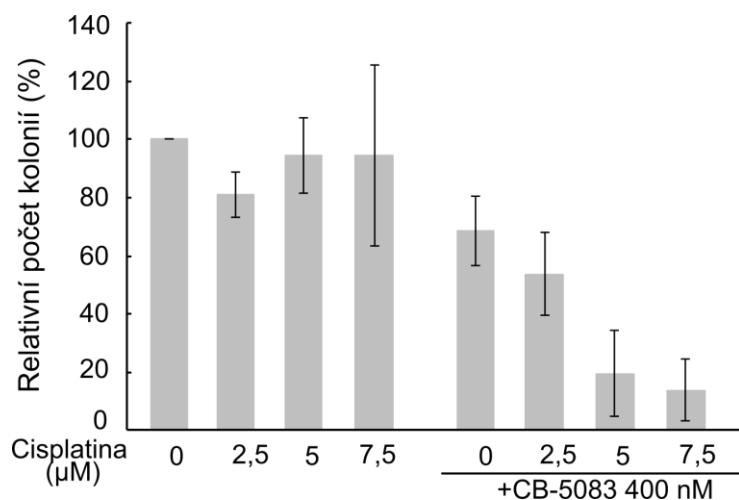
Obr. 36: Křivky přežití buněčných linií U-2 OS a H1299 po působení různých koncentrací cisplatinu. Křivky ukazují průměr hodnot relativního počtu kolonií ze tří nezávislých experimentů a směrodatné odchylky těchto hodnot.

Samotný inhibitor P97 způsobil v buněčné linii U-2 OS snížení relativního počtu kolonií přibližně o 20 % oproti neošetřeným buňkám. Samotné působení cisplatinu se projevilo snížením počtu buněk schopných vytvářet kolonie o přibližně 30–45 % v závislosti na její dávce. Při kombinaci obou látek se pokles v relativním počtu kolonií u všech zkoumaných koncentrací chemoterapeutika výrazně prohloubil, a to o více než polovinu (**Obr. 37**), což značí jejich vzájemnou potenciaci a aditivní účinek.



Obr. 37: Účinek cisplatinu v kombinaci s CB-5083 na příkladu buněčné linie U-2 OS. Sloupcový graf ukazuje průměr hodnot relativního počtu kolonií ze tří nezávislých experimentů a směrodatné odchylky těchto hodnot.

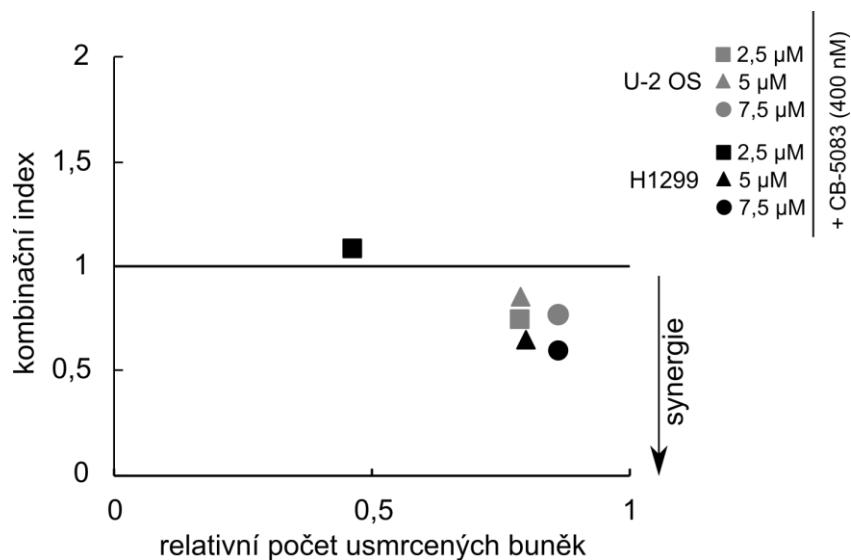
V buněčné linii H1299 nevykazovala samotná cisplatina žádný větší účinek na relativní počet kolonií. Působení samotného inhibitoru CB-5083 se v této linii projevilo přibližně 30% poklesem v počtu buněk schopných tvořit kolonie oproti kontrole. Cisplatina ve všech zvolených koncentracích potencovala účinky inhibitoru segregázy P97. Razantní pokles v relativním počtu kolonií byl zaznamenán zejména u 5 a 7,5 μM koncentrací chemoterapeutika (**Obr. 38**).



Obr. 38: Účinek cisplatin v kombinaci s CB-5083 na příkladu buněčné linie H1299.

Sloupcový graf ukazuje průměr hodnot relativního počtu kolonií ze tří nezávislých experimentů a směrodatné odchylky těchto hodnot.

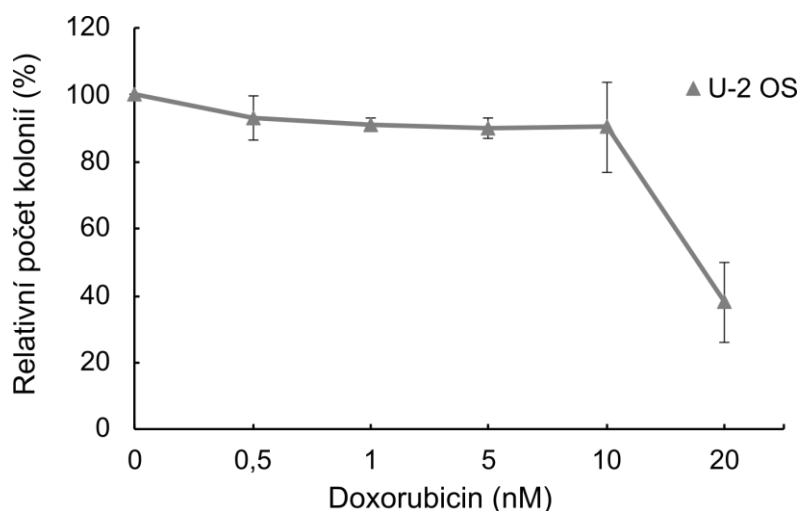
Pro identifikaci, zda kombinace léčiv vykazuje synergický efekt, byl vypočítán prostřednictvím softwaru CompuSyn kombinační index (CI) tohoto páru léčiv. K synergickému účinku kombinovaných látek dochází, je-li kombinační index menší než hodnota 1 (tj. $\text{CI} < 1$). z **Obr. 39** je tedy zřejmé, že v buněčné linii U-2 OS disponují látky synergickým efektem ve všech zkoumaných koncentracích. V buněčné linii H1299 byla prokázána synergie CB-5083 s cisplatinou v koncentracích 5 a 7,5 μM .



Obr. 39: Hodnocení synergického efektu cisplatinu na působení CB-5083 v buněčných liniích U-2 OS a H1299. Synergie byla vyhodnocena na základě průměrných hodnot ze tří nezávislých experimentů.

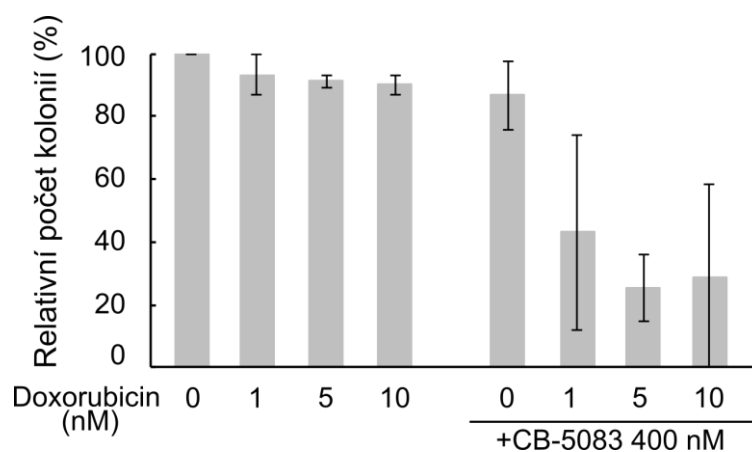
Kombinované ošetření cisplatinou a CB-5083 vede ke snížení relativního počtu buněk schopných vytvářet kolonie ve srovnání s buňkami ošetřenými samotnou cisplatinou a samotným inhibítorem segregázy P97. Výsledky z obou testovaných buněčných linií prokazují, že ošetření buněk CB-5083 potencuje účinek cisplatinu na rakovinné buňky. Taktéž byl v obou buněčných liniích prokázán synergický efekt obou látek.

Dále bylo studováno, zda by nemohl inhibitor CB-5083 potencovat účinek doxorubicinu obdobnou cestou jako u cisplatinu. V případě doxorubicinu však byla v rámci této práce pozorována rozdílná citlivost použitých buněčných linií na toto chemoterapeutikum. Na buněčné linii U-2 OS byl pozorován rapidní pokles v relativním počtu kolonií při koncentraci 20 nM (**Obr. 40**), kdežto buněčná linie H1299 vykazovala rezistenci i při koncentraci 40 nM (data nejsou uvedena). Z toho důvodu byl potenciální aditivní a synergický efekt chemoterapeutika v kombinaci s inhibítorem P97 hodnocen pouze v linii U-2 OS. Jako optimální pro kombinaci s CB-5083 byly zvoleny koncentrace doxorubicinu v rozmezí 1-10 nM.



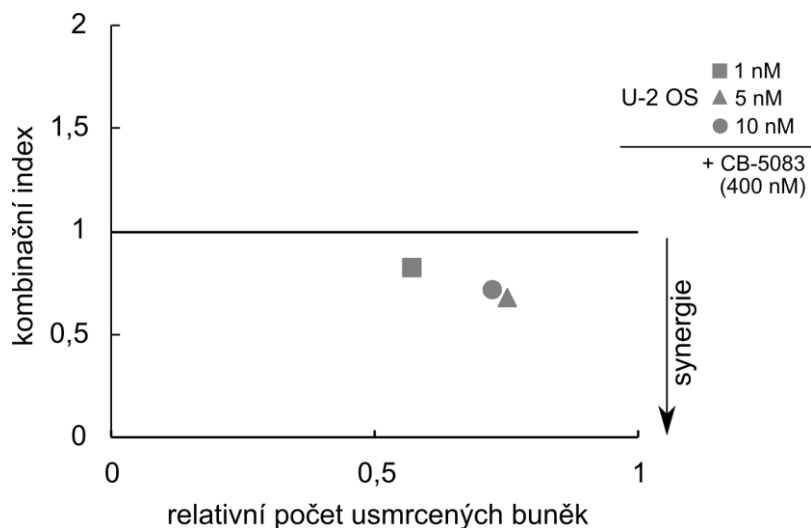
Obr. 40: Křivka přežití buněčné linie U-2 OS po působení různých koncentrací doxorubicinu. Křivka ukazuje průměr hodnot relativního počtu kolonií ze tří nezávislých experimentů a směrodatné odchytky těchto hodnot.

Samotný doxorubicin měl jen malý vliv na pokles relativního počtu kolonií. CB-5083 ve 400 nM koncentraci se projevil snížením relativního počtu kolonií na 87 %. Působil-li inhibitor současně za doprovodu doxorubicinu, poklesy v relativním počtu kolonií byly více než poloviční. Inhibitor ve spojení s 1 nM koncentrací doxorubicinu způsobil pokles relativního počtu kolonií na 43 %, ve spojení s 5 nM koncentrací doxorubicinu na 25 % a ve spojení 10 nM koncentrací doxorubicinu na 28 % (**Obr. 41**).



Obr. 41: Účinek doxorubicinu v kombinaci s CB-5083 na příkladu buněčné linie U-2 OS. Sloupcový graf ukazuje průměr hodnot relativního počtu kolonií ze tří nezávislých experimentů a směrodatné odchytky těchto hodnot.

Stejně jako na příkladu cisplatinu byl pro identifikaci synergického efektu doxorubicinu a CB-5083 vypočítán prostřednictvím softwaru CompuSyn kombinační index. Z **Obr. 42** je zřejmé, že v buněčné linii U-2 OS vykazují látky vzájemný synergický účinek ve všech zkoumaných koncentracích.



Obr. 42: Hodnocení synergického efektu doxorubicinu na působení CB-5083. Synergie byla vyhodnocena na základě průměrných hodnot ze tří nezávislých experimentů.

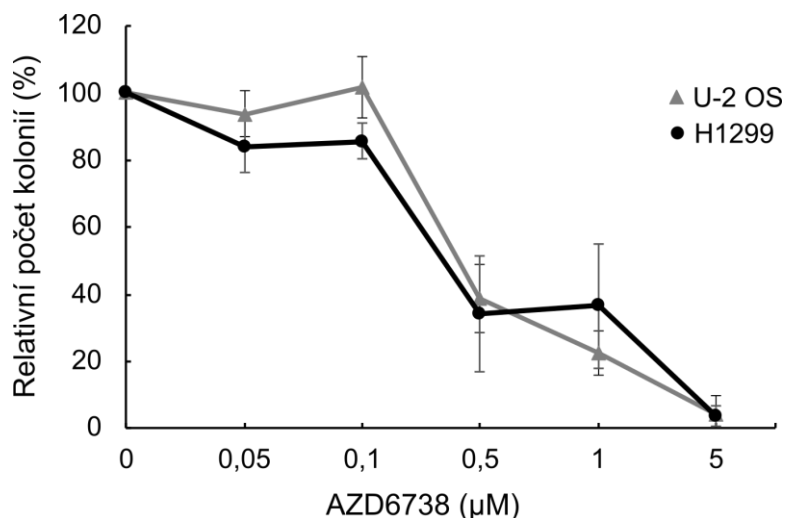
Kombinované ošetření buněk doxorubicinem a CB-5083 vede ke snížení jejich relativního počtu kolonií ve srovnání s buňkami ošetřenými těmito látkami separátně. Pozitivní působení CB-5083 v kombinaci s doxorubicinem se podařilo prokázat pouze v jedné testované buněčné linii. Výsledky nicméně naznačují, že ošetření buněk CB-5083 potencuje účinek doxorubicinu minimálně v této buněčné linii. Rovněž byl v linii U-2 OS prokázán vzájemný synergický efekt obou látek.

5.3.3 Inhibitor segregázy P97 CB-5083 nepotencuje účinek inhibitoru ATR AZD6738

P97 byl identifikován jako nový substrát členů rodiny PIKK v buňkách vystavených látkám poškozujícím DNA. Segregáza P97 totiž disponuje motivem, který je v reakci na genotoxické léčby fosforylován (Livingstone *et al.*, 2005). Proto se kromě studia účinků CB-5083 s klasickými metodami chemoterapie a radioterapie jeví velmi zajímavým sledovat efekt kombinace inhibitoru segregázy P97 s inhibitorem ATR AZD6738, který je slibným kandidátem pro léčbu rakoviny generováním replikačního stresu.

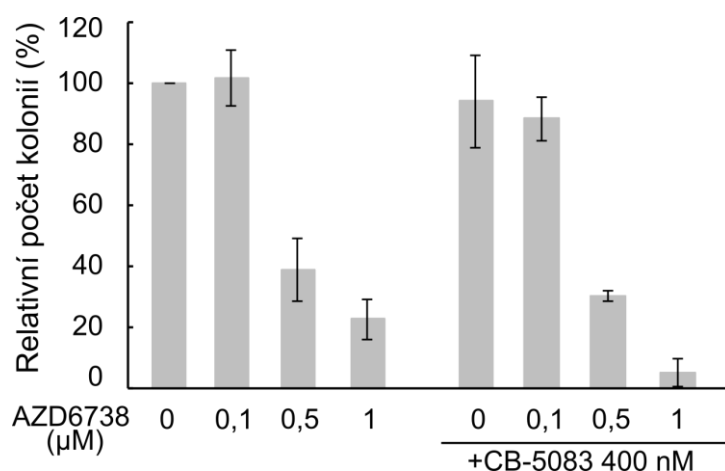
Pro stanovení vhodných koncentrací inhibitoru ATR byl sledován vliv koncentrační řady AZD6738 na relativní počet kolonií buněčných linií U2-OS a H1299 (**Obr. 43**). Koncentrace

v rozmezí 0,1-1 μM byly v obou buněčných liniích zvoleny jako vhodné pro hodnocení aditivního účinku k CB-5083.

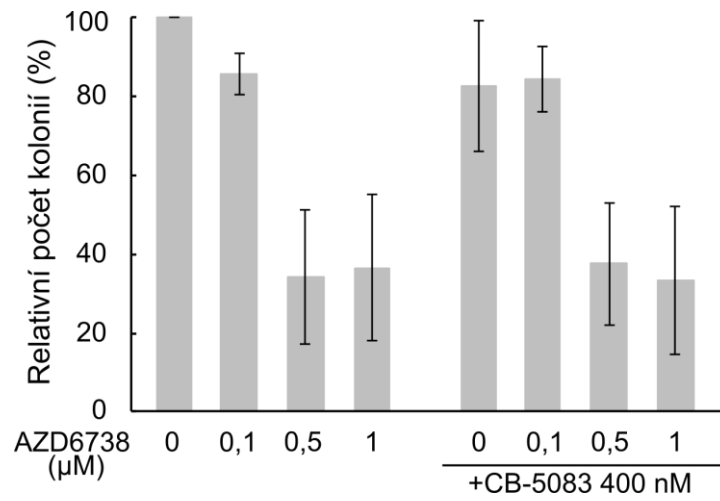


Obr. 43: Křivky přežití buněčné linie U-2 OS po působení různých koncentrací doxorubicinu. Sloupcový graf ukazuje průměr hodnot relativního počtu kolonií ze tří nezávislých experimentů a směrodatné odchylky těchto hodnot.

Jak je patrné z **Obr. 44** a **45**, efekt přidání CB-5083 v obou buněčných liniích takřka nulový. Největší vzájemná potenciace inhibitorů se projevila u buněčné linie U-2 OS při kombinaci CB-5083 s 1 μM AZD6738.



Obr. 44: AZD6738 v kombinaci s CB-5083 na příkladu buněčné linie U-2 OS nevykazuje aditivní účinek. Sloupcový graf ukazuje průměr hodnot relativního počtu kolonií ze tří nezávislých experimentů a směrodatné odchylky těchto hodnot.



Obr. 45: AZD6738 v kombinaci s CB-5083 na příkladu buněčné linie H1299 nevykazuje aditivní účinek. Sloupcový graf ukazuje průměr hodnot relativního počtu kolonií ze tří nezávislých experimentů a směrodatné odchylky těchto hodnot.

6 DISKUZE

Záměrem této práce bylo blíže specifikovat roli proteinového komplexu P97/NPL4 při opravě poškozené DNA. Vývoj léčiv, které narušují odbourávání bílkovin a indukují tím proteotoxický stres, má značný potenciál pro protirakovinnou terapii (Vekaria *et al.*, 2016). Cílení proteinu P97, který je nejen zapojený do procesu degradace bílkovin prostřednictvím ubikvitin-proteazomového systému, ale také do rozpoznání polyubikvitinačních signálů v místech poškozené DNA, má tak potenciál překonat nedostatky proteazomových inhibitorů, které se potýkají s nedostatečnou aktivitou v solidních nádorech a vznikající rezistencí (Milano *et al.*, 2009; Wright, 2010; Zhou *et al.*, 2015; Vekaria *et al.*, 2016). Vývoj inhibitorů dalších regulátorů proteostázy je tak jedním z nadějných směrů protinádorové terapie (Parzych *et al.*, 2019).

V rámci experimentální části této diplomové se podařilo potvrdit, že se P97-GFP rekrutuje do míst poškozené DNA, což bylo prokázáno kolokalizací s markerem γ H2AX, a tyto poznatky jsou v souladu se závěry předchozích studií (Fujito *et al.*, 2013; He *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2020; Jang *et al.*, 2021). Při bližším studiu dynamiky P97-GFP se dále v rámci této diplomové práce podařilo na příkladu dvou buněčných linií prokázat, že translokace tohoto GFP-značeného proteinu do míst lézí nastává asi ve třetí minutě od indukce poškození. V buněčné linii U-2 OS-P97-GFP začal signál GFP-značeného proteinu slábnout ve třicáté minutě po vzniku poškození, kdežto u buněčné linie H1299-P97-GFP bylo pozorováno vytrácení signálu z míst lézí přibližně v patnácté minutě od vzniku poškození. Při studiu dynamiky NPL4-GFP bylo sledováno, že i rekrutování tohoto kofaktoru P97 do míst lézí probíhá kolem třetí minuty od indukce poškození a signál slábne po třicáté minutě. Lze se tedy domnívat, že se P97-GFP váže na poškozenou DNA spolu s NPL4-GFP. Předpokládá se, že NPL4 rozpoznává a váže ubikvitin prostřednictvím specifické domény s motivem zinkových prstů, tzv. NZF (NPL4 Zinc Finger), která se vyskytuje v C-terminální doméně proteinu, čímž usnadňuje přístup segregáze P97 k polyubikvitinovaným substrátům (Meyer *et al.*, 2002). Jednou z hypotéz bylo, že v buňkách mutantní buněčné linie C-term-MUT (Škrott *et al.*, 2017) s mutacemi v NZF doméně nebude probíhat translokace NPL4-GFP do míst indukovaného poškození, což se ale nepotvrdilo, a signál C-term-MUT-NPL4-GFP se v těchto místech vyskytoval. Lze proto spekulovat, že za rozpoznávání a záchyt ubikvitinu nemusí být zodpovědná výhradně NZF doména a je také možné, že mutagenézí vytvořená změna v aminokyselinové sekvenci zinkového prstu oblasti NZF nemá na vazbu ubikvitinu vliv. Kromě této domény se v proteinu nachází také putativní doména zinkového prstu (ZF-NPL4) (Lass *et al.*, 2008), proto byl studován také vliv mutace této domény na rekrutování NPL4-GFP do míst lézí. V buňkách mutantní buněčné linie PUT-MUT (Škrott *et al.*, 2017) byly pozorovány dvě formy NPL4-GFP. Agregovaná imobilní forma se do míst poškození nerekrutovala a v místě dráhy laseru byly viditelné „negativní stripy“, které vznikly pravděpodobně jako důsledek vysvícení pozičně stabilního signálu NPL4-GFP. Mimo tuto agregovanou formu byla v PUT-MUT buněčné linii přítomna difúzní neagregovaná forma, která umožňovala slabé rekrutování NPL4-GFP

v místě poškození DNA.

Dále bylo testováno, zda bude rekrutování GFP-značených P97 a NPL4 ovlivněno inhibitory různých složek ubikvitin-proteazomového systému. Podle publikace Rycenga *et al.* (2019) dochází vlivem působení inhibitorů P97 k dramatickému nárůstu hladin tohoto proteinu vázaného na DNA. Při studiu dynamiky P97-GFP po ošetření buněk CB-5083 v rámci této diplomové práce však akumulace GFP-značeného proteinu v místech laserového poškození pozorována nebyla. Efekt úplné inhibice v translokaci P97-GFP do míst lézí po ošetření buněk CB-5083 byl navíc prokázán ve dvou buněčných liniích. Lze se proto domnívat, že k nárůstu hladin segregázy P97 v jádrech buněk působením CB-5083 docházet může, ale takto inhibovaná forma P97 nedokáže polyubikvitinované proteiny vázat, a proto není pozorováno její rekrutování v místech poškození. Protože vazbu P97 do míst dvouřetězcových zlomů usnadňuje ubikvitinace (Acs *et al.*, 2011), byl otestován vliv ztráty této ubikvitinace. Pro simulování deplece ubikvitinu byl v rámci mé diplomové práce využit inhibitor ubikvitin-aktivačního enzymu UBA1 MLN7243, po jehož působení opravdu k žádnému rekrutování P97-GFP v místě poškození nedošlo, čímž lze potvrdit také výsledky Rycenga *et al.* (2019). Oslabené rekrutování GFP-značeného P97 oproti neošetřené kontrole (mock) bylo pozorováno v buňkách ošetřených Bortezomibem (BTZ) a velmi slabé rekrutování tohoto proteinu bylo viditelné také v buňkách ošetřených CuET (250 nM). Přestože v důsledku tvorby agregátu NPL4-P97 vede CuET k nesprávné funkci této segregázy, jak uvádí Škrott *et al.*, 2017, ke slabé akumulaci P97-GFP však v místě laserového poškození docházelo. Bylo by proto vhodné otestovat také vyšší koncentraci CuET, jelikož může být účinek tohoto inhibitoru závislý na jeho použité dávce.

V rámci studia dynamiky P97-GFP byl rovněž otestován vliv dalších presenzitizačních činidel na rekrutování tohoto proteinu. Bylo pozorováno, že po vystavení buněk účinkům BrdU probíhala jeho translokace do míst poškození se stejnou časovou dynamikou, jako v případě 8-MOP, který byl použit u všech ostatních experimentů. V případě vystavení buněk účinkům Hoechst33258 docházelo k rekrutování proteinu ihned po indukci poškození DNA, což je zajímavé a bylo by vhodné otestovat, zda by činidlo Hoechst33258 takto ovlivnilo i další proteiny zapojené do DDR.

Dále se práce zaměřuje na studium vlivu inhibitorů různých složek UPS na dynamiku NPL4-GFP. Po ošetření buněk Bortezomibem došlo k rekrutování NPL4-GFP do oblastí poškození DNA, stejně jako to bylo pozorováno na příkladu P97-GFP. Po vystavení buněk působení inhibitoru CB-5083 bylo sledováno jen velmi slabé shlukování GFP-značeného proteinu v místě poškození. Po působení MLN7243 byl pozorován jen velmi slabý signál NPL4-GFP v místech indukovaného poškození. Při použití 0,5 μ M koncentrace CuET ještě k omezenému rekrutování NPL4-GFP do míst poškození DNA docházelo, kdežto vlivem 1 μ M CuET byla v buňkách indukována tvorba proteinových klastrů připomínající agregáty NPL4

mutantních buněk PUT-MUT. Tato skutečnost podporuje domněnku, že je efekt CuET závislý na dávce, a bylo by proto vhodné v dalších experimentech v rámci studia dynamiky P97-GFP studovat ještě vliv 1 μM CuET.

Vzhledem k tomu, že hlavními substráty P97 na poškozené DNA jsou ubikvitinované proteiny, byl následně monitorován Ub-GFP reportér, který se chová jako ubikvitin a bývá tedy rovněž zabudován do polyubikvitinovaných řetězců. Oproti silnému Ub-GFP signálu v kontrolních buňkách se působení Bortezomibu (BTZ) projevilo omezeným signálem GFP-značeného ubikvitinu v místech poškození. Akumulace Ub-GFP v místech lézí vrcholila ve 30 minutách od indukce poškození. V buňkách ošetřených CB-5083 se signál Ub-GFP v místech poškození oproti kontrolním buňkám jevil silnějším a výraznějším. P97 je zodpovědná za segregaci polyubikvitinových substrátů z míst poškození DNA, čímž dává znamení pro vazbu dalších signalizačních a opravných proteinů. Z důvodu extrakce polyubikvitinovaných substrátů by přirozeně docházelo k postupnému poklesu signálu GFP-značeného ubikvitinu v místě indukovaných lézí (Meerang *et al.*, 2011; Puumalainen *et al.*, 2014). Buňky s narušenou funkcí P97 však vykazují zvýšenou akumulaci polyubikvitinovaných řetězců na dvouvláknových zlomech, a v souvislosti s tímto dochází také k narušení opravných drah DNA (Meerang *et al.*, 2011). Lze se proto domnívat, že za silnější signál Ub-GFP viditelný po vystavení buněk účinkům CB-5083, je zodpovědná právě nadměrná vazba Ub-GFP do míst poškození a znemožnění extrakce polyubikvitinovaných substrátů z poškozené DNA. Inaktivace P97 vede rovněž ke zvýšení celkové hladiny ubikvitin ligázy RNF8 (Singh *et al.*, 2019), která pozorovanou akumulaci ubikvitinu v místě poškození může také odrážet. K simulaci narušení ubikvitinační kaskády byl v rámci této diplomové práce použit MLN7243, který je silným inhibitorem ubikvitin aktivačního enzymu UBA1. Po jeho působení nebyl signál Ub-GFP v místech poškození pozorován.

Veškeré buněčné fenotypy indukované laserovou mikroiradiací a vlivem inhibitorů různých složek UPS byly v rámci této diplomové práce hodnoceny pouze kvalitativně (vizuálně) s cílem získat počáteční vhled do dynamiky studovaných proteinů. Pro jednoznačnou interpretaci výsledků by bylo potřeba provést přesnou kvantifikaci, která je však v případě stripů velmi obtížná a náročná, a mohla by být předmětem dalších studií. Z důvodu této limitace je potřeba mikroskopické výsledky v této práci považovat spíše za předběžné.

Dále byla v buňkách ošetřených kombinací CB-5083 a mikroiradiací viditelná výrazná změna buněčné morfologie. Bylo vyzorováno, že ke změnám v morfologii buněk nedochází při vystavení buněk samotnému UV-A záření ani samotnému CB-5083, a výrazný dopad na strukturu buňky vykazuje až jejich kombinace. Spolupůsobení laserové mikroiradiace a inhibitoru P97 je pro buňky silně toxické, a tento efekt by bylo vhodné dále sledovat z hlediska jejich možné vzájemné potenciace.

Jelikož je segregáza P97 všudypřítomným proteinem podílejícím se na mnoha základních buněčných procesech, které byly nastíněny v literárním přehledu této práce, přetrvávají obavy ohledně jejího cílení z důvodu obecné toxicity vyvíjejících se inhibitorů. Bylo prokázáno, že embryonální delece P97 je u myši letální (Müller *et al.*, 2007) a že mutace v tomto proteinu může vyvolat několik závažných neurologických onemocnění (Yamanaka *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2016). Tato pozorování naznačují, že úplná a ireverzibilní inhibice P97 může vyvolat závažnou obecnou nebo neurologickou toxicitu. Úrovně inhibice P97 pro protinádorovou terapii tedy mohou vyžadovat reverzibilní inhibitory s nižší toxicitou (Nishimura *et al.*, 2019). Jelikož CB-5083 působí jako ATP-kompetitivní a reverzibilní inhibitor P97, má potenciál pro využití v klinické praxi. V rámci této diplomové práce bylo prokázáno, že v CB-5083 ošetřených buňkách dochází k inhibici traslokace P97-GFP a jeho kofaktoru do míst poškození a že inhibitor CB-5083 vykazuje ve spojení s UV-A zářením silnou toxicitu. To nás přivedlo na myšlenku, zda by nemohl CB-5083 potencovat také účinky chemoterapeutik a IR záření.

Testem tvorby kolonií (CFA; Colony Formation Assay) byl studován vliv tohoto inhibitoru na běžně používaná chemoterapeutika a IR záření. Výsledky ukazují, že kombinované ošetření IR a CB-5083 vede v buněčných liniích H1299 a U-2 OS ke snížení relativního počtu buněk tvořících kolonie ve srovnání s buňkami vystavenými samotnému IR, což znamená, že spolupůsobení CB-5083 s IR záření působí na rakovinné buňky velmi toxicky. Tato vzájemná potenciace byla prokázána na příkladu dvou buněčných linií. Dále se práce zaměřuje na studium efektu CB-5083 s běžně používanými chemoterapeutiky cisplatinou a doxorubicinem. Kombinované ošetření cisplatinou a CB-5083 vede ke snížení relativního počtu buněk schopných vytvářet kolonie ve srovnání s buňkami ošetřenými samotnou cisplatinou a samotným inhibitorem segregázy P97. Výsledky z obou testovaných buněčných linií prokazují, že CB-5083 potencuje účinek cisplatinu na rakovinné buňky. Taktéž byl v obou buněčných liniích prokázán synergický efekt obou látek. Účinky doxorubicinu byly hodnoceny pouze v buněčné linii U-2 OS, protože buňky H1299 vykazovaly vůči tomuto chemoterapeutiku rezistenci. Podařilo se prokázat, že kombinované ošetření buněk doxorubicinem a CB-5083 vede ke snížení relativního počtu kolonií ve srovnání s buňkami ošetřenými těmito látkami separátně. Rovněž byl v linii U-2 OS prokázán vzájemný synergický efekt obou látek.

Navzdory slibné protirakovinové aktivitě CB-5083 došlo k selhání tohoto inhibitoru ve veškerých dosavadních klinických testech kvůli jeho nežádoucím účinkům (Tang *et al.*, 2019). Skupině Roux *et al.* (2021), která testovala vliv inhibitoru P97 druhé generace CB-5339, se podařilo prokázat, že tento nově vyvinutý inhibitor vykazuje synergický efekt v kombinaci antracykliny. Navíc dle dosavadních pozorování překonává nedostatky inhibitoru P97 první generace a jeho silné nežádoucí účinky, za které byla zodpovědná fosfodiesteráza 6. Vstoupil proto do první fáze klinických testů u pacientů s akutní myeloidní leukemií a myelodysplastickým

syndromem (NCT04402541) a solidními nádory a lymfomy (NCT04372641).

Velmi zajímavé poznatky do problematiky P97 přinesli také Zhu *et al.* (2020), kteří charakterizovali Ser⁷⁸⁴ fosforylovanou formu P97/VCP (pSer⁷⁸⁴-VCP) jako prognostický biomarker rakoviny, který může potenciálně předpovídat chemoterapeutickou odpověď kvůli svému významu pro DDR. Přestože již Livingstone *et al.* (2005) detekovali pSer⁷⁸⁴-VCP v oblastech poškozené DNA v reakci na různé genotoxické léčby a následně její výskyt v poškozených oblastech v reakci na IR a UV potvrdili také Matsuoka *et al.* (2007) a Stokes *et al.* (2007), význam Ser⁷⁸⁴ fosforylované formy proteinu zůstával dosud neznámý. Zjištění Zhu *et al.* (2020), že fosforylace Ser⁷⁸⁴ specificky zvyšuje aktivitu P97 v místě poškození, je překvapivé, vzhledem k jejich dalším poznatkům, že pSer 784 -VCP interaguje s kofaktory NPL4 a UFD1 s nižší afinitou. Kromě snížené interakce s kofaktory a polyubikvitinovanými substráty se zdá, že pSer⁷⁸⁴-VCP asociuje s nižší afinitou také s chromatinem. Navrhli tak, že fosforylace Ser⁷⁸⁴ může podporovat extrakci polyubikvitinovaného substrátu urychlením disociace segregázy a jejích kofaktorů NPL4-UFD1 v místě poškození. Předpokládá se, že Ser⁷⁸⁴ mohou být v reakci na různé genotoxické látky fosforylovány všemi třemi hlavními kinázami v rodině PIKK (ATM, ATR a DNA-PK). Byl proto v rámci této diplomové práce otestován rovněž vliv inhibitoru ATR na relativní počet kolonií v kombinaci s inhibitorem P97. Aditivní efekt CB-5083 na inhibitor ATR AZD6738 byl v obou buněčných liniích takřka nulový. Jejich kombinace se tak na rozdíl od kombinace CB-5083 s klasickými chemoterapeutiky nejeví jako dobrá strategie pro cílení na protein P97.

7 ZÁVĚR

Diplomová práce si kladla za cíl prohloubit znalosti o roli proteinového komplexu P97/NPL4 při opravě poškozené DNA. Jelikož je tento komplex nezbytným regulátorem homeostázy proteinů, byly v první části literárního přehledu sepsány současné znalosti o jeho zapojení do degradace bílkovin. Druhá část literárního přehledu byla zaměřena už na samotnou roli P97 a jeho kofaktorů při opravě poškozené DNA.

Podářilo se prokázat, že se P97-GFP a NPL4-GFP rekrutují do míst poškození DNA se stejnou časovou dynamikou a je tedy pravděpodobné, že se do míst lézí vážou společně. Při studiu vlivu inhibitorů různých složek UPS na translokaci GFP-značených proteinů do míst poškození bylo vyzorováno, že největší vliv na rekrutování P97-GFP a NPL4-GFP měl inhibitor P97 CB-5083 a inhibitor ubikvitinačního enzymu UBA1 MLN7243. Po jejich působení nebyl v případě P97-GFP v buňkách se stabilní expresí pozorován žádný viditelný signál, v případě NPL4-GFP došlo k velmi omezené vazbě tohoto proteinu do míst poškození. Působením Bortezomibu a CuET (0,25 a 0,5 μM) došlo k oslabené translokaci obou GFP-značených proteinů do míst lézí oproti kontrolním neošetřeným buňkám, přesto byl jejich signál dobře viditelný. Závažný dopad na vazbu NPL4-GFP do míst lézí měl CuET v 1 μM koncentraci, jehož působení indukovalo tvorbu agregátů tohoto proteinu. Podobný fenotyp byl pozorovatelný také v buňkách exprimujících PUT-MUT-NPL4-GFP. Zajímavé zjištění bylo učiněno při studiu vlivu mutace v NZF doméně NPL4. Uvádí se, že je to primárně tato doména, která rozpoznává a váže ubikvitin, proto bylo očekáváno, že mutace NZF bude mít za následek inhibici v rekrutování NPL4-GFP do míst lézí. Tento efekt však v buňkách mutantní buněčné linie C-term-MUT pozorován nebyl, což může vnést nové světlo a další poznatky do studia NPL4.

Další data získaná v této práci ukazují silný toxický efekt CB-5083 v kombinaci s UV-A zářením, IR-zářením a chemoterapeutiky cisplatinou a doxorubicinem. Podářilo se prokázat, že kombinované působení inhibitoru P97 a IR záření bylo mnohem toxičtější než působení samotného inhibitoru nebo vystavení buněk samotnému IR záření. Bylo rovněž zjištěno, že CB-5083 potencuje účinky cisplatinu a prostřednictvím výpočtu kombinačního indexu bylo také určeno, že látky vykazují vzájemnou synergii. Synergický účinek byl prokázán rovněž u kombinace CB-5083 s doxorubicinem. Jejich synergie a vzájemná potenciace byla hodnocena z důvodu chemorezistence H1299 na doxorubicin pouze v buněčné linii U-2 OS.

Výsledky uváděné v této diplomové práci jasně ukazují, že CB-5083 inhibuje rekrutování P97-GFP a NPL4-GFP do míst indukovaného poškození, a dále vykazuje silnou toxicitu v kombinaci s UV-A a IR zářením a chemoterapeutiky doxorubicinem a cisplatinou. Přestože v experimentech provedených v rámci této práce vykazuje slibné výsledky, nelze přehlédnout fakt, že v dosavadních klinických studiích tento inhibitor selhal kvůli nežádoucím účinkům. Vzhledem k redundanci P97 a důležitosti této segregázy v mnoha buněčných procesech je třeba

v rámci jejího cílení postupovat velmi opatrně. Bude zajímavým sledovat, jak si během klinických testů povede inhibitor P97 druhé generace CB-5339, který do I. fáze testování vstoupil v tomto roce.

8 LITERATURA

Abraham, R. T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Development*, 15(17), 2177–2196.

Accardi, F., Toscani, D., Bolzoni, M., Dalla Palma, B., Aversa, F., Giuliani, N. (2015). Mechanism of Action of Bortezomib and the New Proteasome Inhibitors on Myeloma Cells and the Bone Microenvironment: Impact on Myeloma-Induced Alterations of Bone Remodeling. *BioMed Research International*, 172458.

Acs, K., Luijsterburg, M. S., Ackermann, L., Salomons, F. A., Hoppe, T., Dantuma, N. P. (2011). The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(12), 1345–1350.

Acharya, U., Jacobs, R., Peters, J.-M., Watson, N., Farquhar, M. G., Malhotra, V. (1995). The formation of golgi stacks from vesiculated golgi membranes requires two distinct fusion events. *Cell*, 82(6), 895–904.

Al-Hakim, A., Escribano-Diaz, C., Landry, M.-C., O'Donnell, L., Panier, S., Szilard, R. K., Durocher, D. (2010). The ubiquitous role of ubiquitin in the DNA damage response. *DNA Repair*, 9(12), 1229–1240.

Almond, J. B., Cohen, G. M. (2002). The proteasome: A novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, 16(4), 433–443.

Amerik, A. Y., Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1695(1), 189–207.

Amm, I., Sommer, T., Wolf, D. H. (2014). Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin–proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(1), 182–196.

Anderson, D. J., Le Moigne, R., Djakovic, S., Kumar, B., Rice, J., Wong, S., Wang, J., Yao, B., Valle, E., Kiss von Soly, S., Madriaga, A., Soriano, F., Menon, M.-K., Wu, Z. Y., Kampmann, M., Chen, Y., Weissman, J. S., Aftab, B. T., Yakes, F. M., Shawver, L., Zhou, H.-J., Wustrow, D., Rolfe, M. (2015). Targeting the AAA ATPase p97 as an Approach to Treat Cancer through Disruption of Protein Homeostasis. *Cancer Cell*, 28(5), 653–665.

Ashrafi, G., Schwarz, T. L. (2013). The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, 20(1), 31–42.

Awasthi, P., Foiani, M., Kumar, A. (2015). ATM and ATR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, 128(23), 4255–4262.

Bártek, J., Bártková, J., Lukáš, J. (2007). DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene*, 26(56), 7773–7779.

Bártek, J., Lukáš, J. (2007). DNA damage checkpoints: From initiation to recovery or adaptation. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2), 238–245.

Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., Yeoh, K.-W. (2012). Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), 193–199.

Bassing, C. H., Alt, F. W. (2004). The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair*, 3(8), 781–796.

Bastola, P., Chien, J. (2018). Co-selected mutations in VCP: A novel mechanism of resistance to VCP inhibitors. *Cell Death & Disease*, 9(2).

Bedford, L., Paine, S., Sheppard, P. W., Mayer, R. J., Roelofs, J. (2010). Assembly, Structure and Function of the 26S proteasome. *Trends in cell biology*, 20(7), 391–401.

Bergink, S., Ammon, T., Kern, M., Schermelleh, L., Leonhardt, H., Jentsch, S. (2013). Role of Cdc48/p97 as a SUMO-targeted segregase curbing Rad51–Rad52 interaction. *Nature Cell Biology*, 15(5), 526–532.

Bešše, L., Matějčiková, J., Sedlaříková, L., Kryukov, F., Hájek, R., Ševčíková, S. (2013). Proteasome Inhibitors in Treatment of Multiple Myeloma. *Klinická onkologie*, 26(1), 11–18.

Bešše, L., Pour, L., Sedlaříková, L., Hájek, R., Ševčíková, S. (2014). Proteasome inhibitors – molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(6), 947–961.

Blackford, A. N., Jackson, S. P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular Cell*, 66(6), 801–817.

Boer, D. R., Bijlmakers, M.-J. (2019). Differential Inhibition of Human and Trypanosome Ubiquitin E1S by TAK-243 Offers Possibilities for Parasite Selective Inhibitors. *Scientific Reports*, 9(1), 16195.

Borissenko, L., Groll, M. (2007). 20S proteasome and its inhibitors: Crystallographic knowledge for drug development. *Chemical Reviews*, 107(3), 687–717.

Brinkmann, K., Schell, M., Hoppe, T., Kashkar, H. (2015). Regulation of the DNA damage response by ubiquitin conjugation. *Frontiers in Genetics*, 6(98).

Buisson, R., Boisvert, J. L., Benes, C. H., Zou, L. (2015). Distinct but Concerted Roles

of ATR, DNA-PK, and Chk1 in Countering Replication Stress during S Phase. *Molecular Cell*, 59(6), 1011–1024.

Buisson, R., Niraj, J., Rodrigue, A., Ho, C. K., Kreuzer, J., Foo, T. K., Hardy, E. J.-L., Dellaire, G., Haas, W., Xia, B., Masson, J.-Y., Zou, L. (2017). Coupling of Homologous Recombination and the Checkpoint by ATR. *Molecular Cell*, 65(2), 336–346.

Byrne, D. J., Harmon, M. J., Simpson, J. C., Blackstone, C., O’Sullivan, N. C. (2017). Roles for the VCP co-factors Npl4 and Ufd1 in neuronal function in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Genetics and Genomics*, 44(10), 493–501.

Ciechanover, A., Kwon, Y. T. (2017). Protein Quality Control by Molecular Chaperones in Neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience*, 11(185).

Cox, J., Weinman, S. (2016). Mechanisms of doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma. *Hepatic Oncology*, 3(1), 57–59.

Cron, K. R., Zhu, K., Kushwaha, D. S., Hsieh, G., Merzon, D., Rameseder, J., Chen, C. C., D’Andrea, A. D., Kozono, D. (2013). Proteasome Inhibitors Block DNA Repair and Radiosensitize Non-Small Cell Lung Cancer. *PLOS ONE*, 8(9), 73710.

Cutts, S. M., Nudelman, A., Rephaeli, A., Phillips, D. R. (2005). The Power and Potential of Doxorubicin-DNA Adducts. *IUBMB Life*, 57(2), 73–81.

Cvek, B. (2012). Nonprofit drugs as the salvation of the world’s healthcare systems: The case of Antabuse (disulfiram). *Drug Discovery Today*, 17(9), 409–412.

Dai, R. M., Li, C.-C. H. (2001). Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin–proteasome degradation. *Nature Cell Biology*, 3(8), 740–744.

Dantuma, N. P., Groothuis, T. A. M., Salomons, F. A., Neefjes, J. (2006). A dynamic ubiquitin equilibrium couples proteasomal activity to chromatin remodeling. *Journal of Cell Biology*, 173(1), 19–26.

Dardalhon, M., Lin, W., Nicolas, A., Averbeck, D. (2007). Specific transcriptional responses induced by 8-methoxypsoralen and UVA in yeast. *FEMS Yeast Research*, 7(6), 866–878.

Deshaies, R. J. (2014). Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy. *BMC Biology*, 12(94).

DeVita, V. T., & Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research*,

68(21), 8643–8653.

Dinić, J., Efferth, T., García-Sosa, A. T., Grahovac, J., Padrón, J. M., Pajeva, I., Rizzolio, F., Saponara, S., Spengler, G., Tsakovska, I. (2020). Repurposing old drugs to fight multidrug resistant cancers. *Drug Resistance Updates*, 52(100713).

Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D. H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., Lukas, J., & Lukas, C. (2009). RNF168 Binds and Amplifies Ubiquitin Conjugates on Damaged Chromosomes to Allow Accumulation of Repair Proteins. *Cell*, 136(3), 435–446.

Dou, Q. P., Zonder, J. A. (2014). Overview of Proteasome Inhibitor-Based Anti-cancer Therapies: Perspective on Bortezomib and Second Generation Proteasome Inhibitors versus Future Generation Inhibitors of Ubiquitin-Proteasome System. *Current cancer drug targets*, 14(6), 517–536.

Drabløs, F., Feyzi, E., Aas, P. A., Vaagbø, C. B., Kavli, B., Bratlie, M. S., Peña-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., Krokan, H. E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair*, 3(11), 1389–1407.

Dufour, P., Lang, J. M., Giron, C., Duclos, B., Haehnel, P., Jaeck, D., Jung, J. M., Oberling, F. (1993). Sodium dithiocarb as adjuvant immunotherapy for high risk breast cancer: A randomized study. *Biotherapy (Dordrecht, Netherlands)*, 6(1), 9–12.

Eastman, A. (1987). The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacology & Therapeutics*, 34(2), 155–166.

Elkholi, R., Floros, K. V., Chipuk, J. E. (2011). The Role of BH3-Only Proteins in Tumor Cell Development, Signaling, and Treatment. *Genes & Cancer*, 2(5), 523–537.

Esseltine, D.-L., Mulligan, G. (2012). An historic perspective of proteasome inhibition. *Seminars in Hematology*, 49(3), 196–206.

Eykelenboom, J. K., Harte, E. C., Canavan, L., Pastor-Peidro, A., Calvo-Asensio, I., Llorens-Agost, M., & Lowndes, N. F. (2013). ATR activates the S-M checkpoint during unperturbed growth to ensure sufficient replication prior to mitotic onset. *Cell Reports*, 5(4), 1095–1107.

Fan, C.-H., Liu, W.-L., Cao, H., Wen, C., Chen, L., & Jiang, G. (2013). O⁶-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas. *Cell Death & Disease*, 4(10), 876–876.

Feng, L., Chen, J. (2012). The E3 ligase RNF8 regulates KU80 removal and NHEJ repair.

Nature Structural & Molecular Biology, 19(2), 201–206.

Fennell, D. A., Chacko, A., Mutti, L. (2008). BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. *Oncogene*, 27(9), 1189–1197.

Foote, K. M., Blades, K., Cronin, A., Fillery, S., Guichard, S. S., Hassall, L., Hickson, I., Jacq, X., Jewsbury, P. J., McGuire, T. M., Nissink, J. W. M., Odedra, R., Page, K., Perkins, P., Suleman, A., Tam, K., Thommes, P., Broadhurst, R., Wood, C. (2013). Discovery of 4-{4-[(3R)-3-Methylmorpholin-4-yl]-6-[1-(methylsulfonyl)cyclopropyl]pyrimidin-2-yl}-1H-indole (AZ20): A potent and selective inhibitor of ATR protein kinase with monotherapy in vivo antitumor activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(5), 2125–2138.

Foote, K. M., Lau, A., Nissink, J. W. M. (2015). Drugging ATR: Progress in the development of specific inhibitors for the treatment of cancer. *Future Medicinal Chemistry*, 7(7), 873–891.

Foote, K. M., Nissink, J. W. M., McGuire, T., Turner, P., Guichard, S., Yates, J. W. T., Lau, A., Blades, K., Heathcote, D., Odedra, R., Wilkinson, G., Wilson, Z., Wood, C. M., Jewsbury, P. J. (2018). Discovery and Characterization of AZD6738, a Potent Inhibitor of Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3 Related (ATR) Kinase with Application as an Anticancer Agent. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(22), 9889–9907.

Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319.

Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M. S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M., D'Andrea, A. D. (2001). Interaction of the Fanconi Anemia Proteins and BRCA1 in a Common Pathway. *Molecular Cell*, 7(2), 249–262.

Gianfaldoni, S., Gianfaldoni, R., Wollina, U., Lotti, J., Tchernev, G., Lotti, T. (2017). An Overview on Radiotherapy: From Its History to Its Current Applications in Dermatology. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 5(4), 521–525.

Giglia-Mari, G., Zotter, A., Vermeulen, W. (2011). DNA Damage Response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), 745.

Goldberg, A. L., Dice, J. F. (1974). Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. *Annual Review of Biochemistry*, 43(0), 835–869.

Goldberg, A L, St. John, A. C. (1976). Intracellular Protein Degradation in Mammalian and Bacterial Cells: Part 2. *Annual Review of Biochemistry*, 45(1), 747–804.

Goldberg, Alfred L. (2012). Development of proteasome inhibitors as research tools and

cancer drugs. *The Journal of Cell Biology*, 199(4), 583–588.

Goldstein, M., Kastan, M. B. (2015). The DNA Damage Response: Implications for Tumor Responses to Radiation and Chemotherapy. *Annual Review of Medicine*, 66(1), 129–143.

Gong, B., Radulovic, M., Figueiredo-Pereira, M. E., Cardozo, C. (2016). The Ubiquitin-Proteasome System: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer’s Disease and Spinal Cord Injury. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9(4).

Harris, J. R. (1971). The proteins released from intact erythrocyte ‘ghosts’ at low ionic strength. *The Biochemical Journal*, 122(5), 38-40.

He, J., Zhu, Q., Wani, G., Sharma, N., Han, C., Qian, J., Pentz, K., Wang, Q., Wani, A. A. (2014). Ubiquitin-specific Protease 7 Regulates Nucleotide Excision Repair through Deubiquitinating XPC Protein and Preventing XPC Protein from Undergoing Ultraviolet Light-induced and VCP/p97 Protein-regulated Proteolysis*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(39), 27278–27289.

Her, N.-G., Toth, J. I., Ma, C.-T., Wei, Y., Motamedchaboki, K., Sergienko, E., Petroski, M. D. (2016). P97 composition changes caused by allosteric inhibition are suppressed by an on-target mechanism that increases the enzyme’s ATPase activity. *Cell chemical biology*, 23(4), 517–528.

Heride, C., Urbé, S., Clague, M. J. (2014). Ubiquitin code assembly and disassembly. *Current Biology*, 24(6), 215–220.

Hershko, A., Ciechanover, A. (1998). THE UBIQUITIN SYSTEM. *Annual Review of Biochemistry*, 67(1), 425–479.

Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., Adams, J., & Anderson, K. C. (2002). NF- κ B as a Therapeutic Target in Multiple Myeloma *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 16639–16647.

Horton, T. M., Gannavarapu, A., Blaney, S. M., D’Argenio, D. Z., Plon, S. E., Berg, S. L. (2006). Bortezomib interactions with chemotherapy agents in acute leukemia in vitro. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 58(1), 13–23.

Hovest, M. G., Brüggelolte, N., Hosseini, K. S., Krieg, T., Herrmann, G. (2006). Senescence of Human Fibroblasts after Psoralen Photoactivation Is Mediated by ATR Kinase and Persistent DNA Damage Foci at Telomeres. *Molecular Biology of the Cell*, 17(4), 1758–1767.

Huang, L., Chen, C. H. (2009). Proteasome regulators: Activators and inhibitors. *Current*

medicinal chemistry, 16(8), 931–939.

Hyer, M. L., Milhollen, M. A., Ciavarrri, J., Fleming, P., Traore, T., Sappal, D., Huck, J., Shi, J., Gavin, J., Brownell, J., Yang, Y., Stringer, B., Griffin, R., Bruzzese, F., Soucy, T., Duffy, J., Rabino, C., Riceberg, J., Hoar, K., Lublinsky, A., Menon, S., Sintchak, M., Bump, N., Pulukuri, S.M., Langston, S., Tirrell, S., Kuranda, M., Veiby, P., Newcomb, J., Li, P., Wu, J.T., Powe, J., Dick, L. R., Greenspan, P., Galvin, K., Manfredi, M., Claiborne, Ch., Amidon, B., Bence, N.F. (2018). A small-molecule inhibitor of the ubiquitin activating enzyme for cancer treatment. *Nature Medicine*, 24(2), 186–193.

Champoux, J. J. (2001). DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 369–413.

Chen, B., Retzlaff, M., Roos, T., Frydman, J. (2011a). Cellular Strategies of Protein Quality Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), 4374.

Chen, D., Frezza, M., Schmitt, S., Kanwar, J., Dou, Q. P. (2011b). Bortezomib as the First Proteasome Inhibitor Anticancer Drug: Current Status and Future Perspectives. *Current Cancer Drug Targets*, 11(3), 239–253.

Cheung-Ong, K., Giaever, G., Nislow, C. (2013). DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: Serendipity and chemical biology. *Chemistry & Biology*, 20(5), 648–659.

Cho, H. J., Kim, J. K., Kim, K. D., Yoon, H. K., Cho, M.-Y., Park, Y. P., Jeon, J. H., Lee, E. S., Byun, S.-S., Lim, H. M., Song, E. Y., Lim, J.-S., Yoon, D.-Y., Lee, H. G., Choe, Y.-K. (2006). Upregulation of Bcl-2 is associated with cisplatin-resistance via inhibition of Bax translocation in human bladder cancer cells. *Cancer Letters*, 237(1), 56–66.

Chromá, K., Mistrík, M., Moudrý, P., Gurský, J., Liptay, M., Strauss, R., Škrott, Z., Vrtel, R., Bártková, J., Kramara, J., Bártek, J. (2017). Tumors overexpressing RNF168 show altered DNA repair and responses to genotoxic treatments, genomic instability and resistance to proteotoxic stress. *Oncogene*, 36(17), 2405–2422.

Ismail, I. H., Gagné, J.-P., Genois, M.-M., Strickfaden, H., McDonald, D., Xu, Z., Poirier, G. G., Masson, J.-Y., Hendzel, M. J. (2015). The RNF138 E3 ligase displaces Ku to promote DNA end resection and regulate DNA repair pathway choice. *Nature Cell Biology*, 17(11), 1446–1457.

Jackson, S. P., Bártek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071–1078.

Jackson, S. P., Durocher, D. (2013). Regulation of DNA damage responses by ubiquitin

and SUMO. *Molecular Cell*, 49(5), 795–807.

Jacquemont, C., Taniguchi, T. (2007). Proteasome Function Is Required for DNA Damage Response and Fanconi Anemia Pathway Activation. *Cancer Research*, 67(15), 7395–7405.

Jang, S.-M., Redon, C. E., Fu, H., Indig, F. E., Aladjem, M. I. (2021). RepID-deficient cancer cells are sensitized to a drug targeting p97/VCP segregase. *Molecular & Cellular Toxicology*, 17(2), 141–149.

Ji, X., Lu, Y., Tian, H., Meng, X., Wei, M., Cho, W. C. (2019). Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 114, 108800.

Jiao, Y., Hannafon, B. N., Ding, W.-Q. (2016). Disulfiram's Anticancer Activity: Evidence and Mechanisms. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 16(11), 1378–1384.

Jin, M. H., Oh, D.-Y. (2019). ATM in DNA repair in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 203(107391).

Ju, J.-S., Fuentealba, R. A., Miller, S. E., Jackson, E., Piwnica-Worms, D., Baloh, R. H., Weihl, C. C. (2009). Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *Journal of Cell Biology*, 187(6), 875–888.

Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., Roos, W. P. (2007). MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair*, 6(8), 1079–1099.

Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 573–584.

Kim, J. J., Kumbhar, R., Gong, F., Miller, K. M. (2019). In Time and Space: Laser Microirradiation and the DNA Damage Response. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1999, 61–74.

Kim, S.-Y., Song, X., Zhang, L., Bartlett, D. L., Lee, Y. J. (2014). Role of Bcl-xL/Beclin-1 in interplay between apoptosis and autophagy in oxaliplatin and bortezomib-induced cell death. *Biochemical Pharmacology*, 88(2), 178–188.

Kiwerska, K., Szyfter, K. (2019). DNA repair in cancer initiation, progression, and therapy – A double-edged sword. *Journal of Applied Genetics*, 60(3), 329.

Klopsteck, P., Ewens, C. A., Förster, A., Zhang, X., Freemont, P. S. (2012). Regulation

of p97 in the ubiquitin–proteasome system by the UBX protein-family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(1), 125–129.

Komander, D., Rape, M. (2012). The Ubiquitin Code. *Annual Review of Biochemistry*, 81(1), 203–229.

Konac, E., Varol, N., Kiliccioglu, I., Bilen, C. Y. (2015). Synergistic effects of cisplatin and proteasome inhibitor bortezomib on human bladder cancer cells. *Oncology Letters*, 10(1), 560–564.

Kors, S., Geijtenbeek, K., Reits, E., Schipper-Krom, S. (2019). Regulation of Proteasome Activity by (Post-)transcriptional Mechanisms. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6(48).

Krokan, H. E., Bjørås, M. (2013). Base Excision Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4).

Kumari, N., Lee, K. K., Jha, S. (2018). Targeting the Ubiquitin Proteasome System in Cancer. *Neoplasia*.

Lass, A., McConnell, E., Fleck, K., Palamarchuk, A., Wójcik, C. (2008). Analysis of Npl4 deletion mutants in mammalian cells unravels new Ufd1-interacting motifs and suggests a regulatory role of Npl4 in ERAD. *Experimental Cell Research*, 314(14), 2715–2723.

Le, L. T. M., Kang, W., Kim, J.-Y., Le, O. T. T., Lee, S. Y., Yang, J. K. (2016). Structural Details of Ufd1 Binding to p97 and Their Functional Implications in ER-Associated Degradation. *PLOS ONE*, 11(9), 163394.

Le Moigne, R., Aftab, B. T., Djakovic, S., Dhimolea, E., Valle, E., Murnane, M., King, E. M., Soriano, F., Menon, M.-K., Wu, Z. Y., Wong, S. T., Lee, G. J., Yao, B., Wiita, A. P., Lam, C., Rice, J., Wang, J., Chesi, M., Bergsagel, P. L., Kraus, M., Driessen, Ch., von Soly, S. K., Yakes, F. M., Wustrow, D., Shawver, L., Zhou, H.-J., Martin III, T.G., Wolf, J.L., Mitsiades, C. S., Anderson, D.J., Rolfe, M. (2017). The p97 Inhibitor CB-5083 Is a Unique Disrupter of Protein Homeostasis in Models of Multiple Myeloma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(11), 2375–2386.

Lecker, S. H., Goldberg, A. L., & Mitch, W. E. (2006). Protein Degradation by the Ubiquitin–Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(7), 1807–1819.

Lecona, E., Fernandez-Capetillo, O. (2018). Targeting ATR in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(9), 586–595.

Li, G.-M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*,

18(1), 85–98.

Li, L., Wei, C., Kim, I.-K., Janssen-Heininger, Y., & Gupta, S. (2014). Inhibition of nuclear factor- κ B in the lungs prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in mice. *Hypertension*, 63(6), 1260–1269.

Lieber, M. R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 1–5.

Limoli, C. L., Ward, J. F. (1993). A new method for introducing double-strand breaks into cellular DNA. *Radiation Research*, 134(2), 160–169.

Livingstone, M., Ruan, H., Weiner, J., Clauser, K. R., Strack, P., Jin, S., Williams, A., Greulich, H., Gardner, J., Venere, M., Mochan, T. A., DiTullio, R. A., Moravcevic, K., Gorgoulis, V. G., Burkhardt, A., Halazonetis, T. D. (2005). Valosin-Containing Protein Phosphorylation at Ser784 in Response to DNA Damage. *Cancer Research*, 65(17), 7533–7540.

Lukáš, J., Lukáš, C., Bártek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: Signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair*, 3(8), 997–1007.

Lukáš, J., Lukáš, C., & Bártek, J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nature Cell Biology*, 13(10), 1161–1169.

Maréchal, A., Zou, L. (2013). DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), 12716.

Matsuoka, S., Ballif, B. A., Smogorzewska, A., McDonald, E. R., Hurov, K. E., Luo, J., Bakalarski, C. E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S. P., & Elledge, S. J. (2007). ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science*, 316(5828), 1160–1166.

Meerang, M., Ritz, D., Paliwal, S., Garajova, Z., Bosshard, M., Mailand, N., Janscak, P., Hübscher, U., Meyer, H., Ramadan, K. (2011). The Ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks. *Nature Cell Biology*, 13(11), 1376–1382.

Meyer, H., Bug, M., Bremer, S. (2012). Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nature Cell Biology*, 14(2), 117–123.

Meyer, H. H., Shorter, J. G., Seemann, J., Pappin, D., Warren, G. (2000). A complex of mammalian Ufd1 and Npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *The EMBO Journal*, 19(10), 2181–2192.

Meyer, H. H., Wang, Y., Warren, G. (2002). Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1–Npl4. *The EMBO Journal*, 21(21), 5645–5652.

Milano, A., Perri, F., Caponigro, F. (2009). The ubiquitin–proteasome system as a molecular target in solid tumors: An update on bortezomib. *OncoTargets and therapy*, 2, 171–178.

Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 185–229.

Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Richardson, P. G., Poulaki, V., Tai, Y.-T., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., Bailey, C., Joseph, M., Libermann, T. A., Schlossman, R., Munshi, N. C., Hideshima, T., Anderson, K. C. (2003). The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: Therapeutic applications. *Blood*, 101(6), 2377–2380.

Mladenov, E., Iliakis, G. (2011). The Pathways of Double-Strand Break Repair. *DNA Repair - On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors*, Francesca Storici, IntechOpen, DOI: 10.5772/24572.

Müller, J. M. M., Deinhardt, K., Rosewell, I., Warren, G., Shima, D. T. (2007). Targeted deletion of p97 (VCP/CDC48) in mouse results in early embryonic lethality. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(2), 459–465.

Murakawa, Y., Sonoda, E., Barber, L. J., Zeng, W., Yokomori, K., Kimura, H., Niimi, A., Lehmann, A., Zhao, G. Y., Hohegger, H., Boulton, S. J., Takeda, S. (2007). Inhibitors of the Proteasome Suppress Homologous DNA Recombination in Mammalian Cells. *Cancer Research*, 67(18), 8536–8543.

Murata, S., Yashiroda, H., Tanaka, K. (2009). Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2), 104–115.

Nabavi, S. F., Atanasov, A. G., Khan, H., Barreca, D., Trombetta, D., Testai, L., Sureda, A., Tejada, S., Vacca, R. A., Pittalà, V., Gulei, D., Berindan-Neagoe, I., Shirooie, S., Nabavi, S. M. (2018). Targeting ubiquitin-proteasome pathway by natural, in particular polyphenols, anticancer agents: Lessons learned from clinical trials. *Cancer Letters*, 434, 101–113.

Nakada, S. (2016). Opposing roles of RNF8/RNF168 and deubiquitinating enzymes in ubiquitination-dependent DNA double-strand break response signaling and DNA-repair pathway choice. *Journal of radiation research*, 1, 33–40.

Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *Journal of Biosciences*, 31(1), 137–155.

Neri, P., Ren, L., Gratton, K., Stebner, E., Johnson, J., Klimowicz, A., Duggan, P., Tassone, P., Mansoor, A., Stewart, D. A., Lonial, S., Boise, L. H., Bahlis, N. J. (2011). Bortezomib-induced “BRCAness” sensitizes multiple myeloma cells to PARP inhibitors. *Blood*, 118(24), 6368–6379.

Nishimura, N., Radwan, M. O., Amano, M., Endo, S., Fujii, E., Hayashi, H., Ueno, S., Ueno, N., Tatetsu, H., Hata, H., Okamoto, Y., Otsuka, M., Mitsuya, H., Matsuoka, M., Okuno, Y. (2019). Novel p97/VCP inhibitor induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in both bortezomib-sensitive and -resistant multiple myeloma cells. *Cancer Science*, 110(10), 3275–3287.

Panier, S., Durocher, D. (2009). Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair*, 8(4), 436–443.

Pantziarka, P., Bouche, G., Meheus, L., Sukhatme, V., Sukhatme, V. P., Vikas, P. (2014). The Repurposing Drugs in Oncology (ReDO) Project. *Ecancermedicalscience*, 8, 422.

Parker, W. B. (2009). Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. *Chemical Reviews*, 109(7), 2880–2893.

Parzych, K., Saavedra-García, P., Valbuena, G. N., Al-Sadah, H. A., Robinson, M. E., Penfold, L., Kuzeva, D. M., Ruiz-Tellez, A., Loaiza, S., Holzmann, V., Caputo, V., Johnson, D. C., Kaiser, M. F., Karadimitris, A., Lam, E. W.-F., Chevet, E., Feldhahn, N., Keun, H. C., Auner, H. W. (2019). The coordinated action of VCP/p97 and GCN2 regulates cancer cell metabolism and proteostasis during nutrient limitation. *Oncogene*, 38(17), 3216–3231.

Perel, G., Bliss, J., Thomas, C. M. (2016). Carfilzomib (Kyprolis): A Novel Proteasome Inhibitor for Relapsed And/or Refractory Multiple Myeloma. *Pharmacy and Therapeutics*, 41(5), 303–307.

Perkins, N. D. (2012). The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(2), 121–132.

Peters, J. M., Walsh, M. J., Franke, W. W. (1990). An abundant and ubiquitous homooligomeric ring-shaped ATPase particle related to the putative vesicle fusion proteins Sec18p and NSF. *The EMBO Journal*, 9(6), 1757–1767.

Pilié, P. G., Tang, C., Mills, G. B., Yap, T. A. (2019). State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(2), 81–104.

Polo, S. E., Jackson, S. P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: A focus on protein modifications. *Genes & Development*, 25(5), 409–433.

Postow, L., Ghenoiu, C., Woo, E. M., Krutchinsky, A. N., Chait, B. T., Funabiki, H. (2008). Ku80 removal from DNA through double strand break-induced ubiquitylation. *The Journal of Cell Biology*, 182(3), 467–479.

Puumalainen, M.-R., Lessel, D., Rütthemann, P., Kaczmarek, N., Bachmann, K., Ramadan, K., Naegeli, H. (2014). Chromatin retention of DNA damage sensors DDB2 and XPC through loss of p97 segregase causes genotoxicity. *Nature Communications*, 5(1), 3695.

Pye, V. E., Beuron, F., Keetch, C. A., McKeown, C., Robinson, C. V., Meyer, H. H., Zhang, X., Freemont, P. S. (2007). Structural insights into the p97-Ufd1-Npl4 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(2), 467–472.

Qi, L., Tsai, B., Arvan, P. (2017). New Insights into the Physiological Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation. *Trends in Cell Biology*, 27(6), 430–440.

Qian, S.-B., Ott, D. E., Schubert, U., Bennink, J. R., Yewdell, J. W. (2002). Fusion proteins with COOH-terminal ubiquitin are stable and maintain dual functionality in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38818–38826.

Rabik, C. A., Dolan, M. E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews*, 33(1), 9–23.

Radhakrishnan, S. K., Lee, C. S., Young, P., Beskow, A., Chan, J. Y., Deshaies, R. J. (2010). Transcription Factor Nrf1 Mediates the Proteasome Recovery Pathway after Proteasome Inhibition in Mammalian Cells. *Molecular Cell*, 38(1), 17–28.

Reinhardt, H. C., Yaffe, M. B. (2013). Phospho-Ser/Thr-binding domains: Navigating the cell cycle and DNA damage response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(9), 563–580.

Reuvers, T. G. A., Kanaar, R., Nonnekens, J. (2020). DNA Damage-Inducing Anticancer Therapies: From Global to Precision Damage. *Cancers*, 12(8), 2098.

Roux, B., Vaganay, C., Vargas, J. D., Alexe, G., Benaksas, C., Pardieu, B., Fenouille, N., Ellegast, J. M., Malolepsza, E., Ling, F., Sodaro, G., Ross, L., Pikman, Y., Conway, A. S., Tang, Y., Wu, T., Anderson, D. J., Moigne, R. L., Zhou, H.-J., Luciano, F., Hartigan, C.R., Galinsky, I., DeAngelo, D.J., Stone, R.M., Auberger, P., Schenone, M., Carr, S.A., Guirouilh-Barbat, J., Lopez, B., Khaled, M., Lage, K., Hermine, O., Hemann, M.T., Puissant, A., Stegmaier, K., Benajiba, L. (2021). Targeting acute myeloid leukemia dependency on VCP-mediated DNA repair through a selective second-generation small-molecule inhibitor. *Science Translational*

Medicine, 13(587).

Russo, A., Fratto, M. E., Bazan, V., Schiró, V., Agnese, V., Cicero, G., Vincenzi, B., Tonini, G., Santini, D. (2007). Targeting apoptosis in solid tumors: The role of bortezomib from preclinical to clinical evidence. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11(12), 1571–1586.

Rycenga, H. B., Wolfe, K. B., Yeh, E. S., & Long, D. T. (2019). Uncoupling of p97 ATPase activity has a dominant negative effect on protein extraction. *Scientific Reports*, 9(1), 10329.

Sato, Y., Tsuchiya, H., Yamagata, A., Okatsu, K., Tanaka, K., Saeki, Y., Fukai, S. (2019). Structural insights into ubiquitin recognition and Ufd1 interaction of Npl4. *Nature Communications*, 10(1), 5708.

Shen, Maryann, Johnson, K., Mays, D., Lipsky, J., Naylor, S. (2001). Determination of in vivo adducts of disulfiram with mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochemical pharmacology*, 61, 537–545.

Shen, Min, Schmitt, S., Buac, D., Dou, Q. P. (2013). Targeting the ubiquitin–proteasome system for cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 17(9), 1091–1108.

Singh, A. N., Oehler, J., Torrecilla, I., Kilgas, S., Li, S., Vaz, B., Guérillon, C., Fielden, J., Hernandez-Carralero, E., Cabrera, E., Tullis, I. D., Meerang, M., Barber, P. R., Freire, R., Parsons, J., Vojnovic, B., Kiltie, A. E., Mailand, N., Ramadan, K. (2019). The p97–Ataxin 3 complex regulates homeostasis of the DNA damage response E3 ubiquitin ligase RNF8. *The EMBO Journal*, 38(21), 102361.

Škrott, Z., Mistrík, M., Andersen, K. K., Friis, S., Majera, D., Gurský, J., Ožďian, T., Bártková, J., Turi, Z., Moudrý, P., Kraus, M., Michalová, M., Václavková, J., Džubák, P., Vrobel, I., Poucková, P., Sedláček, J., Miklovcová, A., Kutt, A., Li, J., Mattová, J., Driessen, Ch., Dou, Q.P., Olsen, J., Hajdúch, M., Cvek, B., Deshaies, R. J., Bártek, J. (2017). Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adapter NPL4. *Nature*, 552(7684), 194–199.

Smeenk, G., Mailand, N. (2016). Writers, Readers, and Erasers of Histone Ubiquitylation in DNA Double-Strand Break Repair. *Frontiers in Genetics*, 7(122).

Smith, J., Mun Tho, L., Xu, N., A. Gillespie, D. (2010). Chapter 3—The ATM–Chk2 and ATR–Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer. In G. F. Vande Woude and G. Klein (Ed.), *Advances in Cancer Research*, 108, 73–112.

Snider, J., Thibault, G., Houry, W. A. (2008). The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. *Genome Biology*, 9(4), 216.

Sobhian, B., Shao, G., Lilli, D. R., Culhane, A. C., Moreau, L. A., Xia, B., Livingston, D. M., Greenberg, R. A. (2007). RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science*, 316(5828), 1198–1202.

Soucy, T. A., Smith, P. G., Milhollen, M. A., Berger, A. J., Gavin, J. M., Adhikari, S., Brownell, J. E., Burke, K. E., Cardin, D. P., Critchley, S., Cullis, C. A., Doucette, A., Garnsey, J. J., Gaulin, J. L., Gershman, R. E., Lublinsky, A. R., McDonald, A., Mizutani, H., Narayanan, U., Olhava, E.J., Peluso, S., Rezaei, M., Sintchak, M.D., Talreja, T., Thomas, M.P., Traore, T., Vyskočil, Š., Weatherhead, G.S., Yu, J., Zhang, J., Dick, L.R., Claiborne, Ch.F., Rolfe, M., Bolen, J.B., Langston, S. P. (2009). An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature*, 458(7239), 732–736.

Spivak, G. (2015). Nucleotide excision repair in humans. *DNA repair*, 36, 13–18.

Stach, L., Freemont, P. S. (2017). The AAA+ ATPase p97, a cellular multitool. *Biochemical Journal*, 474(17), 2953–2976.

Stokes, M. P., Rush, J., MacNeill, J., Ren, J. M., Sprott, K., Nardone, J., Yang, V., Beausoleil, S. A., Gygi, S. P., Livingstone, M., Zhang, H., Polakiewicz, R. D., & Comb, M. J. (2007). Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 19855–19860.

Swatek, K. N., Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Research*, 26(4), 399–422.

Takeshita, T., Wu, W., Koike, A., Fukuda, M., Ohta, T. (2009). Perturbation of DNA repair pathways by proteasome inhibitors corresponds to enhanced chemosensitivity of cells to DNA damage-inducing agents. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64(5), 1039–1046.

Tanaka, K. (2009). The proteasome: Overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 85(1), 12–36.

Tang, W. K., Odzorig, T., Jin, W., Xia, D. (2019). Structural Basis of p97 Inhibition by the Site-Selective Anticancer Compound CB-5083. *Molecular Pharmacology*, 95(3), 286–293.

Teicher, B. A., Tomaszewski, J. E. (2015). Proteasome inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 96(1), 1–9.

Tercero, J. A., Diffley, J. F. (2001). Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature*, 412(6846), 553–557.

Thorslund, T., Ripplinger, A., Hoffmann, S., Wild, T., Uckelmann, M., Villumsen, B., Narita, T., Sixma, T. K., Choudhary, C., Bekker-Jensen, S., Mailand, N. (2015). Histone H1

couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature*, 527(7578), 389–393.

Toledo, L. I., Altmeyer, M., Rask, M.-B., Lukáš, C., Larsen, D. H., Povlsen, L. K., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Bártek, J., Lukáš, J. (2013). ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell*, 155(5), 1088–1103.

Torrecilla, I., Oehler, J., Ramadan, K. (2017). The role of ubiquitin-dependent segregase p97 (VCP or Cdc48) in chromatin dynamics after DNA double strand breaks. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1731), 20160282.

Tsukamoto, S., Yokosawa, H. (2010). Inhibition of the Ubiquitin-Proteasome System by Natural Products for Cancer Therapy. *Planta Medica*, 76(11), 1064–1074.

Turgeon, M.-O., Perry, N. J. S., Poulogiannis, G. (2018). DNA Damage, Repair, and Cancer Metabolism. *Frontiers in Oncology*, 8(15).

van den Boom, J., Meyer, H. (2018). VCP/p97-Mediated Unfolding as a Principle in Protein Homeostasis and Signaling. *Molecular Cell*, 69(2), 182–194.

van den Boom, J., Wolf, M., Weimann, L., Schulze, N., Li, F., Kaschani, F., Riemer, A., Zierhut, C., Kaiser, M., Iliakis, G., Funabiki, H., Meyer, H. (2016). VCP/p97 Extracts Sterically Trapped Ku70/80 Rings from DNA in Double-Strand Break Repair. *Molecular Cell*, 64(1), 189–198.

Vaz, B., Halder, S., & Ramadan, K. (2013). Role of p97/VCP (Cdc48) in genome stability. *Frontiers in Genetics*, 4(60).

Vekaria, Pratikkumar H., Kumar, A., Subramaniam, D., Dunavin, N., Vallurupalli, A., Schoenen, F., Ganguly, S., Anant, S., McGuirk, J. P., Jensen, R. A., Rao, R. (2019). Functional cooperativity of p97 and histone deacetylase 6 in mediating DNA repair in mantle cell lymphoma cells. *Leukemia*, 33(7), 1675–1686.

Vekaria, Pratikkumar Harsukhbhai, Home, T., Weir, S., Schoenen, F. J., Rao, R. (2016). Targeting p97 to Disrupt Protein Homeostasis in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 6(181).

Vendetti, F. P., Lau, A., Schamus, S., Conrads, T. P., O'Connor, M. J., & Bakkenist, C. J. (2015). The orally active and bioavailable ATR kinase inhibitor AZD6738 potentiates the anti-tumor effects of cisplatin to resolve ATM-deficient non-small cell lung cancer in vivo. *Oncotarget*, 6(42), 44289–44305.

Verma, R., Oania, R. S., Kolawa, N. J., Deshaies, R. J. (2013). Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome. *ELife*, 2, 308.

Vlachostergios, P. J., Patrikidou, A., Daliani, D. D., Papandreou, C. N. (2009). The ubiquitin-proteasome system in cancer, a major player in DNA repair. Part 2: Transcriptional regulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(9), 3019–3031.

Voráčková, I., Suchanová, Š., Ulbrich, P., Diehl, W. E., Ruml, T. (2011). Purification of proteins containing zinc finger domains using Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. *Protein expression and purification*, 79(1), 88–95.

Walker, J. R., Corpina, R. A., Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412(6847), 607–614.

Walz, J., Erdmann, A., Kania, M., Typke, D., Koster, A. J., Baumeister, W. (1998). 26S Proteasome Structure Revealed by Three-dimensional Electron Microscopy. *Journal of Structural Biology*, 121(1), 19–29.

Wang, K., Lu, J., Li, R. (1996). The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coordination Chemistry Reviews*, 151, 53–88.

Weber, A. M., Ryan, A. J. (2015). ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 149, 124–138.

Weber, J., Polo, S., Maspero, E. (2019). HECT E3 Ligases: A Tale With Multiple Facets. *Frontiers in Physiology*, 10(370).

Wei, W., Guo, H., Liu, X., Zhang, H., Qian, L., Luo, K., Markham, R. B., Yu, X.-F. (2014). A First-in-Class NAE Inhibitor, MLN4924, Blocks Lentiviral Infection in Myeloid Cells by Disrupting Neddylation-Dependent Vpx-Mediated SAMHD1 Degradation. *Journal of Virology*, 88(1), 745–751.

Willers, H., Azzoli, C. G., Santivasi, W. L., Xia, F. (2013). Basic mechanisms of therapeutic resistance to radiation and chemotherapy in lung cancer. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 19(3), 200–207.

Willis, N., Rhind, N. (2009). Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell Division*, 4(13).

Wright, J. J. (2010). Combination Therapy of Bortezomib with Novel Targeted Agents: An Emerging Treatment Strategy. *Clinical Cancer Research*, 16(16), 4094–4104.

Wu, W. K. K. (2012). Targeting Proteasomal Protein Degradation in Cancer-Letter. *Clinical Cancer Research*, 18(3), 912–912.

Wustrow, D., Zhou, H.-J., Rolfe, M. (2013). Chapter Fourteen—Inhibition of Ubiquitin

Proteasome System Enzymes for Anticancer Therapy. In M. C. Desai (Ed.), *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 48, 205–225.

Xia, D., Tang, W. K., Ye, Y. (2016). Structure and function of the AAA+ ATPase p97/Cdc48p. *Gene*, 583(1), 64–77.

Xu, G. W., Ali, M., Wood, T. E., Wong, D., Maclean, N., Wang, X., Gronda, M., Skrtic, M., Li, X., Hurren, R., Mao, X., Venkatesan, M., Beheshti Zavareh, R., Ketela, T., Reed, J. C., Rose, D., Moffat, J., Batey, R. A., Dhe-Paganon, S., Schimmer, A. D. (2010). The ubiquitin-activating enzyme E1 as a therapeutic target for the treatment of leukemia and multiple myeloma. *Blood*, 115(11), 2251–2259.

Yamanaka, K., Sasagawa, Y., Ogura, T. (2012). Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(1), 130–137.

Yang, Y., Kitagaki, J., Dai, R.-M., Tsai, Y. C., Lorick, K. L., Ludwig, R. L., Pierre, S. A., Jensen, J. P., Davydov, I. V., Oberoi, P., Li, C.-C. H., Kenten, J. H., Beutler, J. A., Vousden, K. H., Weissman, A. M. (2007). Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer Research*, 67(19), 9472–9481.

Yao, Y., Dai, W. (2014). Genomic Instability and Cancer. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, 5, 1000165.

Ye, Y., Meyer, H. H., Rapoport, T. A. (2001). The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature*, 414(6864), 652–656.

Yimit, A., Adebali, O., Sancar, A., Jiang, Y. (2019). Differential damage and repair of DNA-adducts induced by anti-cancer drug cisplatin across mouse organs. *Nature Communications*, 10(1), 309.

Youle, R. J., Narendra, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(1), 9–14.

Yu, H.-M., Wang, T.-C. (2012). Mechanism of cisplatin resistance in human urothelial carcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1226–1237.

Yun, M. H., Hiom, K. (2009). CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature*, 459(7245), 460–463.

Yunmbam, M. K., Li, Q. Q., Mimnaugh, E. G., Kayastha, G. L., Yu, J. J., Jones, L. N., Neckers, L., Reed, E. (2001). Effect of the proteasome inhibitor ALLnL on cisplatin sensitivity in human ovarian tumor cells. *International Journal of Oncology*, 19(4), 741–748.

Zhang, D., Wang, H.-B., Brinkman, K. L., Han, S.-X., Xu, B. (2012). Strategies for targeting the DNA damage response for cancer therapeutics. *Chinese Journal of Cancer*, 31(8), 359–363.

Zhang, Zhao, Wang, Y., Li, C., Shi, Z., Hao, Q., Wang, W., Song, X., Zhao, Y., Jiao, S., Zhou, Z. (2015). The Transitional Endoplasmic Reticulum ATPase p97 Regulates the Alternative Nuclear Factor NF- κ B Signaling via Partial Degradation of the NF- κ B Subunit p100. *Journal of Biological Chemistry*, 290(32), 19558–19568.

Zhang, Zhe, Zhou, L., Xie, N., Nice, E. C., Zhang, T., Cui, Y., Huang, C. (2020). Overcoming cancer therapeutic bottleneck by drug repurposing. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1–25.

Zhou, H.-J., Wang, J., Yao, B., Wong, S., Djakovic, S., Kumar, B., Rice, J., Valle, E., Soriano, F., Menon, M.-K., Madriaga, A., Kiss von Soly, S., Kumar, A., Parlati, F., Yakes, F. M., Shawver, L., Le Moigne, R., Anderson, D. J., Rolfe, M., Wustrow, D. (2015). Discovery of a First-in-Class, Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitor of the p97 AAA ATPase (CB-5083). *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(24), 9480–9497.

Zhu, C., Rogers, A., Asleh, K., Won, J., Gao, D., Leung, S., Li, S., Vij, K. R., Zhu, J., Held, J. M., You, Z., Nielsen, T. O., Shao, J. (2020). Phospho-Ser784-VCP Is Required for DNA Damage Response and Is Associated with Poor Prognosis of Chemotherapy-Treated Breast Cancer. *Cell Reports*, 31(10), 107745.